

PCT/FR99/02329

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 11 OCT 1999
WIPO PCT

F 99/2329

BREVET D'INVENTION

4

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

9787923

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 26 AOUT 1999

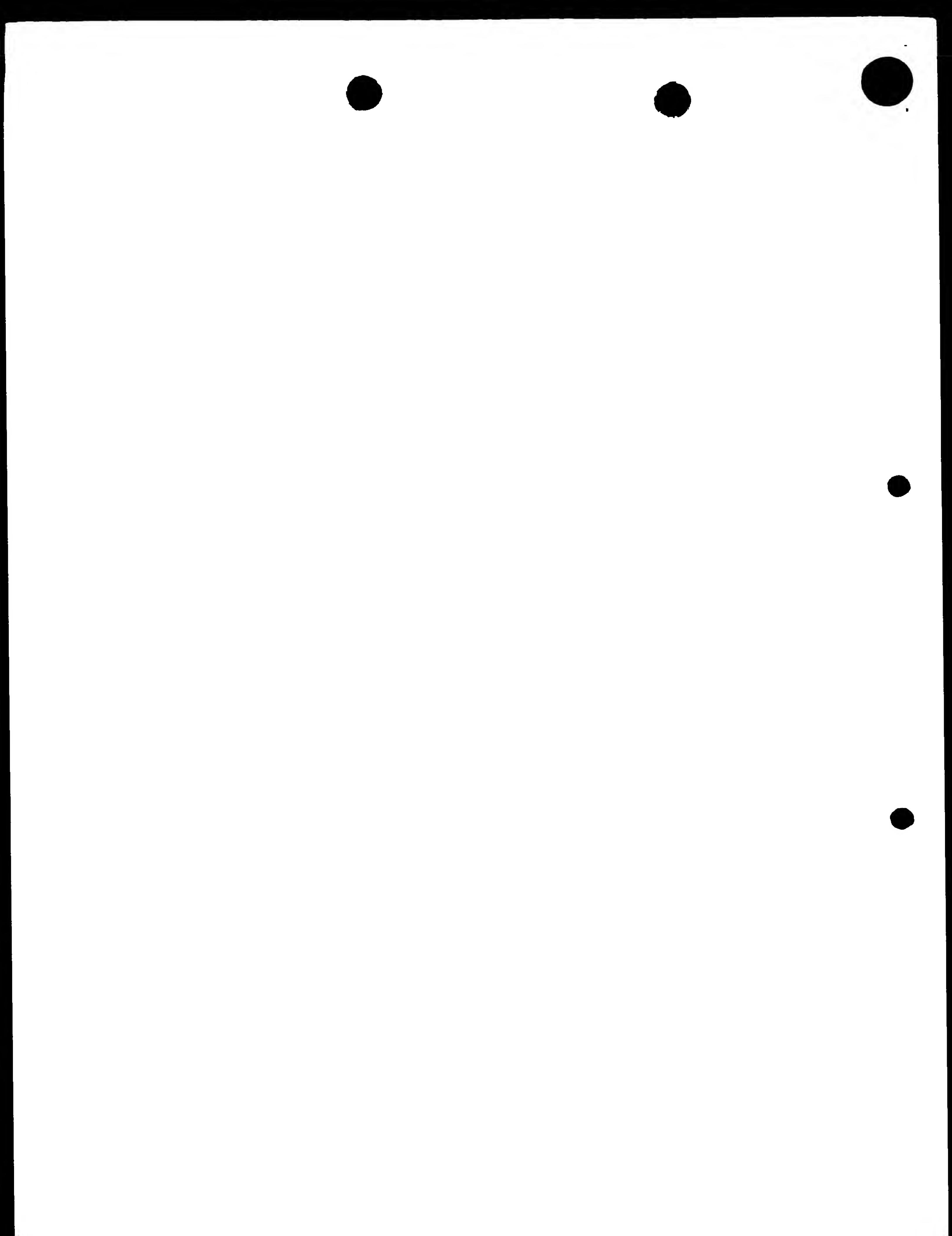
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Telephone 01 53 04 53 04
Telecopie 01 42 93 59 30



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

cerj

N° 55-132

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

REQUETE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Reservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

02 OCT. 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 12366

DEPARTEMENT DE DÉPÔT

02 OCT. 1998

DATE DE DÉPÔT

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention

demande divisionnaire



certificat d'utilité

transformation d'une demande de brevet européen

Établissement du rapport de recherche

Le demandeur personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN PHOSPHOLIPIDE, ET
COMPOSE DE MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT COMPRENNANT
 CETTE STRUCTURE.

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

BREVATOME
25 rue de Ponthieu
75008 PARIS
422-5/S002

n° du pouvoir permanent références du correspondant
07068 du B 13117.3/EE 01 53 83 94 00
12.06.98 BD 1245/UNIVERSITE

date

téléphone

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Forme juridique

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Etablissement de Caractère Scientifique,
Technique et Industriel

UNIVERSITE PIERRE et MARIE CURIE (Paris VI)

Nationalité (s) Française

Pays

Adresse (s) complète (s)

31, 33 rue de la Fédération 75015 PARIS

France

4, Place Jussieu Tour Centrale
75252 PARIS CEDEX 05

France

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs oui non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES requise pour la 1ère fois requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE
pays d'origine

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

M. DES TERMES

422-5/S002

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITE

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

DEPARTEMENT DES BREVETS

B 13117.3/EE

7812366

TITRE DE L'INVENTION :

STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN PHOSPHOLIPIDE,
ET COMPOSE DE MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT
COMPRENNANT CETTE STRUCTURE.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

M.DES TERMES
c/o BREVATOME
25 rue de Ponthieu
75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S)

Alain SANSON

2 Avenue de la Villeneuve
91940 GOMETZ LE CHATEL

Françoise RUSSO-MARIE

105 rue de Bruyères
92310 SEVRES

Jean-Michel NEUMANN

Bât.2 Les Quinconces
91190 GIF SUR YVETTE

Françoise CORDIER-OCHSENBEIN

12 rue des Patriaches
75005 PARIS

Raphael GUEROIS

12 rue des Patriaches
75005 PARIS

FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (si du (des) demandeur (s) ou du mandataire
PARIS LE 2 Octobre 1998

M.DES TERMES
422-5/S002

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

- Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découlle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN
PHOSPHOLIPIDE, ET COMPOSE DE
MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT
COMPRENNANT CETTE STRUCTURE

5

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention se rapporte à une structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide ainsi qu'à une molécule de détection, à un conjugué et à une composition pharmaceutique comprenant ladite structure.

De manière générale, la structure chimique de la présente invention est utile pour la reconnaissance spécifique de vecteurs lipidiques. Elle est utilisable pour l'ingénierie et la création de composés de reconnaissance et de séquestration de lipides notamment de lipides chargés négativement, tels que la phosphatidylsérine et/ou l'acide phosphatidique.

Ces lipides jouent un rôle important notamment dans la signalisation cellulaire et peuvent être présents à la surface externe des membranes des cellules et/ou circuler dans le milieu sanguin à la suite d'événements pathologiques très divers.

Divers événements cellulaires aboutissent à l'apparition de phosphatidylsérine (PS) à la surface externe des cellules, ces événements peuvent résulter soit d'une altération fortuite ou pathologique de la cellule, soit d'un événement cellulaire programmé telle que la mort cellulaire ou apoptose. L'apparition de PS à la surface externe des cellules constitue donc un "message primaire" important témoignant de l'existence d'un dysfonctionnement. Dans le cas du processus de coagulation sanguine, le mécanisme est bien décrit :

l'altération des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, soit pour des raisons accidentelles, soit pour des raisons pathologiques plus complexes, provoque l'apparition de ce message PS à la surface externe des 5 cellules en contact avec le milieu sanguin. Ce message est immédiatement reconnu par certaines protéines circulantes qui déclenchent alors une cascade d'événements aboutissant au phénomène de coagulation sanguine bien connu.

10 L'invention tire profit de la propriété de la structure qu'elle fournit de se lier, en présence ou non de calcium, aux lipides et notamment ceux chargés négativement, pour la mise en point de composés utilisables comme outils de recherche, de diagnostic et 15 de thérapeutique dans le domaine de la reconnaissance des effecteurs lipidiques en général et de la détection de l'apoptose, des troubles de la coagulation sanguine, du choc septique et des pathologies inflammatoires aiguës en particulier.

20 Concernant la recherche et le diagnostic, la structure de l'invention peut par exemple être couplée à des molécules de détection, par exemple à une molécule fluorescente, au complexe avidine-biotine, à un radioélément à vie courte, ou à un composé 25 paramagnétique. Avec ces molécules de détection, il est possible par exemple de détecter des cellules apoptotiques ou de reconnaître des microdomaines membranaires chargés négativement.

La structure de la présente invention peut donc 30 être utilisée pour une détection "in vitro" de pathologies impliquant l'apparition de charges négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules.

La structure de la présente invention peut également être utilisée lorsqu'elle est couplée par exemple à un radioélément à vie courte, pour une détection "in vivo" de zones thrombotiques lors 5 d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, en utilisant des systèmes d'imagerie. Cette structure peut par ailleurs être utilisée lorsqu'elle est couplée à un composé paramagnétique tel qu'un complexe gadolinium pour une détection "in vivo" de 10 zones thrombotiques, en particulier cérébrales, en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Concernant la thérapeutique, de manière générale, la structure de la présente invention peut être utilisée seule ou couplée à une molécule thérapeutique 15 pour préparer un médicament utilisable par exemple par voie orale. Un tel médicament peut par exemple être utilisé pour le ciblage de cette molécule vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs présentant des foyers de cellules apoptotiques 20 ou des tumeurs inflammatoires.

La structure de la présente invention peut par exemple être couplée à des molécules à action thrombolytique pour préparer un médicament qui peut être utilisé par exemple par voie orale en tant 25 qu'anti-coagulant dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose, ou pour préparer une molécule recouvrant tous les biomatériaux thrombogènes. La structure de la présente invention peut donc être utilisée pour le ciblage des molécules thrombolytiques 30 au site du thrombus ou vers les zones thrombogènes.

Dans un autre exemple d'application de la présente invention, la structure de l'invention peut être seule ou couplée à une molécule anti-inflammatoire pour

préparer un médicament qui peut être utilisé par voie orale, par exemple dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la rectocolite hémorragique (RCH), le Crohn, le choc septique, les maladie du collagène et de 5 l'arthrite.

Estat de la technique

Une famille de protéines, appelées annexines, ont été décrites dans l'art antérieur comme présentant un 10 ancrage fonctionnel réversible à la membrane cellulaire, régulé par la concentration en calcium et la présence de phospholipides anioniques. Les annexines constituent une famille de protéines exprimées dans des tissus très divers, aussi bien chez les animaux que 15 chez les plantes. Il semble qu'elles ne sont ni exprimées chez la bactérie, ni chez la levure.

La structure des annexines comporte quatre domaines d'environ 70 acides aminés, ou résidus, très moyennement homologues en séquence mais de topologie 20 quasiment identique.

La figure 1A en annexe est un schéma de la topologie générale d'une annexine et la figure 1B en annexe est un schéma de la topologie d'un domaine de l'annexine portant un site calcium. Sur la figure 1A, C 25 représente l'extrémité C-terminale de cette protéine, N représente l'extrémité N-terminale de cette protéine. Les domaines, notés D1 à D4, sont associés en deux modules, l'un covalent D2D3, l'autre non covalent D1D4. Sur la figure 1B, A représente une première hélice α , B 30 représente une deuxième hélice α , C représente une troisième hélice α , D représente une quatrième hélice α , E représente une cinquième hélice α , et Ca représente l'atome de calcium. L'association de ces

hélices constitue la structure consensus pour un domaine d'annexine.

A l'heure actuelle, leurs rôles biologiques demeurent encore mal définis.

5 Dans le document WO 92/19279, J. TAIT décrit des conjugués ayant une affinité pour des phospholipides. Il décrit en particulier l'utilisation de l'annexine, en particulier de l'annexine V, pour fabriquer un conjugué actif utilisable en tant qu'agent 10 thrombolytique.

Malheureusement, le conjugué décrit dans ce document est préparé à partir de l'annexine entière par un procédé de recombinaison génétique. De ce fait, il apparaît de nombreux inconvénients qui sont notamment 15 un rendement faible, un coût de fabrication élevé, et l'obtention d'un conjugué fragile du fait de sa partie protéique complexe.

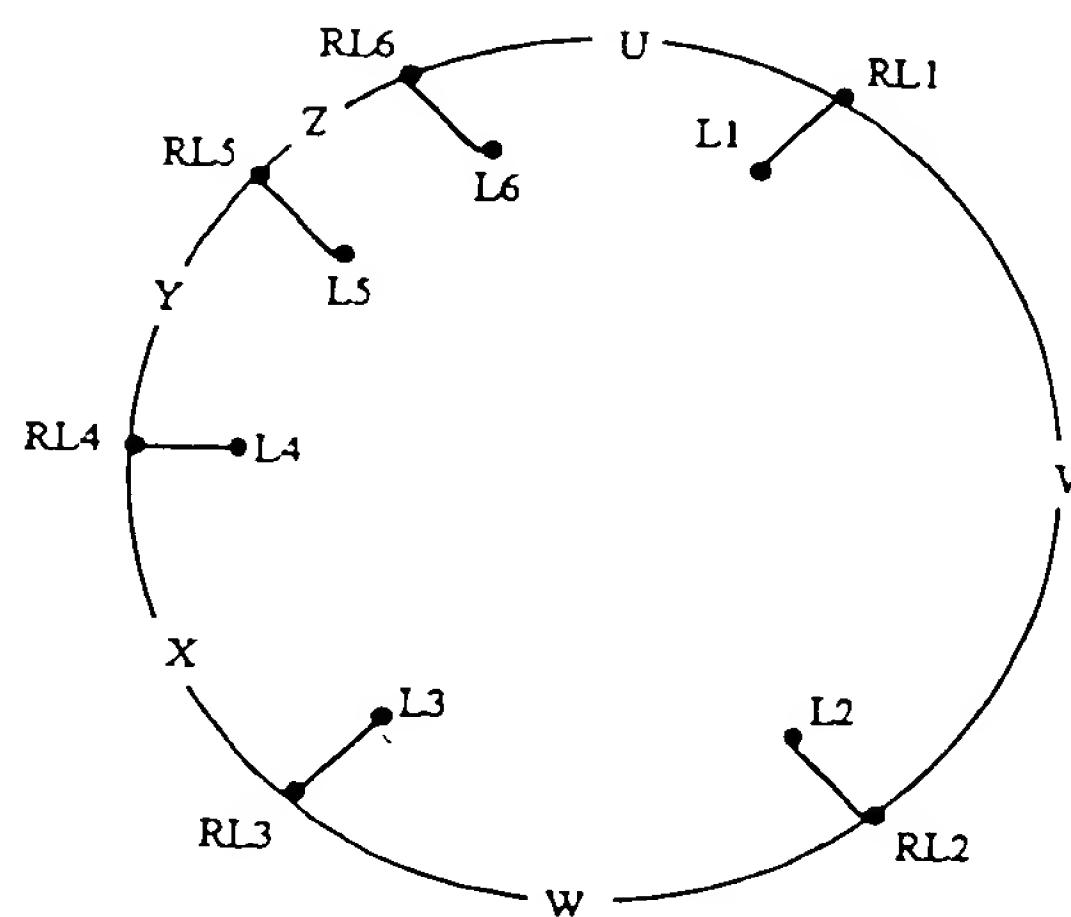
Exposé de l'invention

20 La présente invention a précisément pour but de fournir une structure chimique ayant une affinité spécifique avec un phospholipide. La structure chimique de l'invention présente notamment l'avantage d'être stable chimiquement et de pouvoir être fabriquée de 25 manière reproductive, avec un rendement élevé et un coût de fabrication très réduit par rapport aux composés de l'art antérieur.

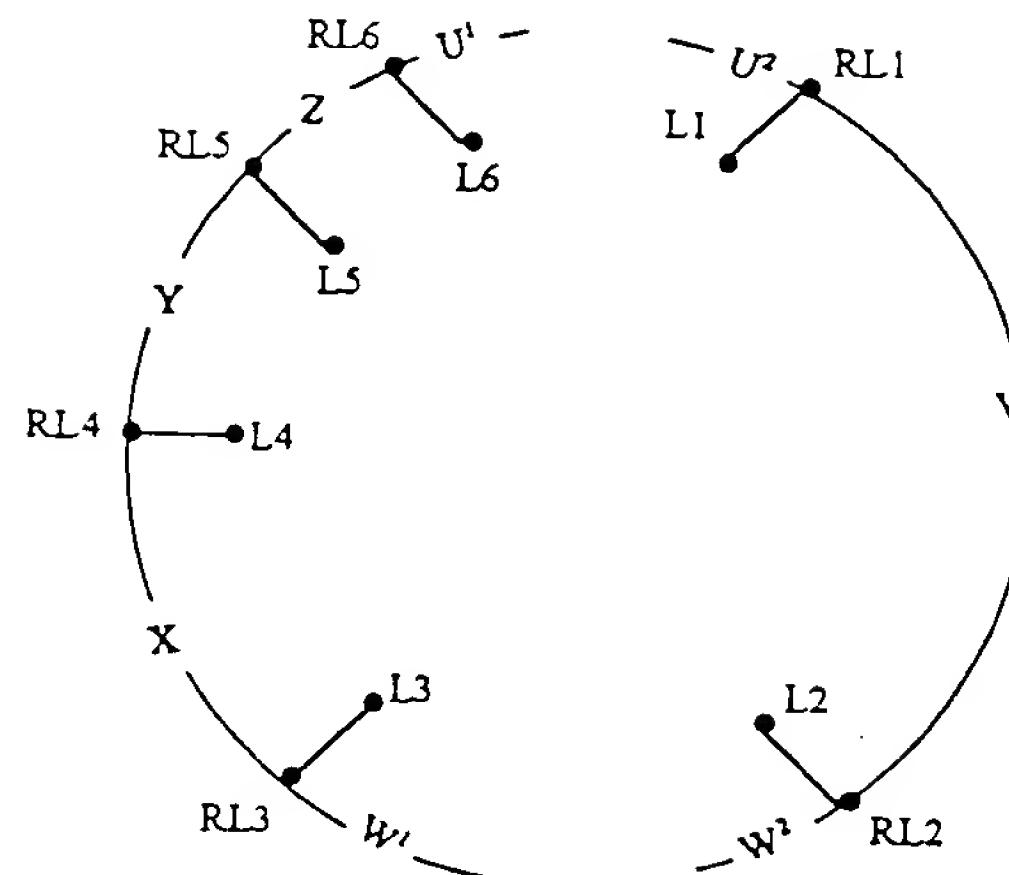
La structure de la présente invention se caractérise en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces

fonctions chimiques définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :

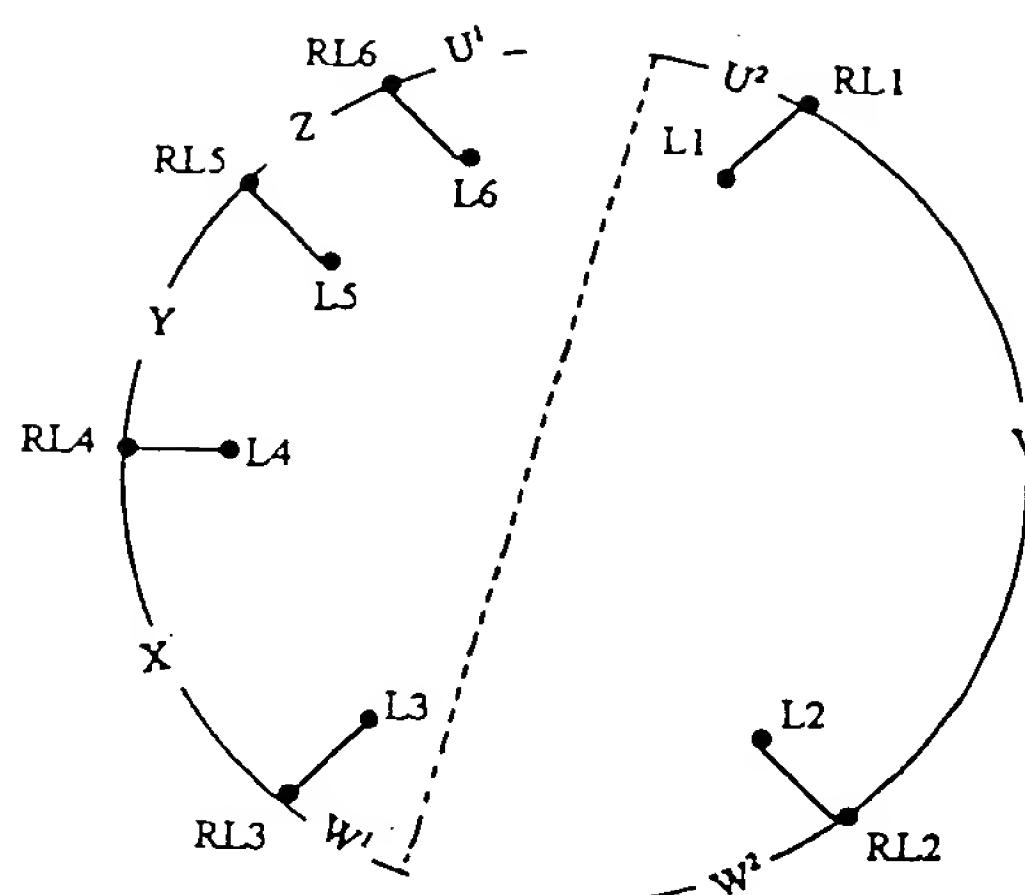
5



(I)



(II)



(III)

5

dans lesquelles U, U^1 , U^2 , V, W, W^1 , W^2 , X, Y, Z sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),

10

dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et
5 dans lesquelles U, U¹, U², V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont
10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont
15 distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm et L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), L1, L2, L3 et L6 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4 et L5 peuvent présenter chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), U, V, W, X, Y et Z peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés.

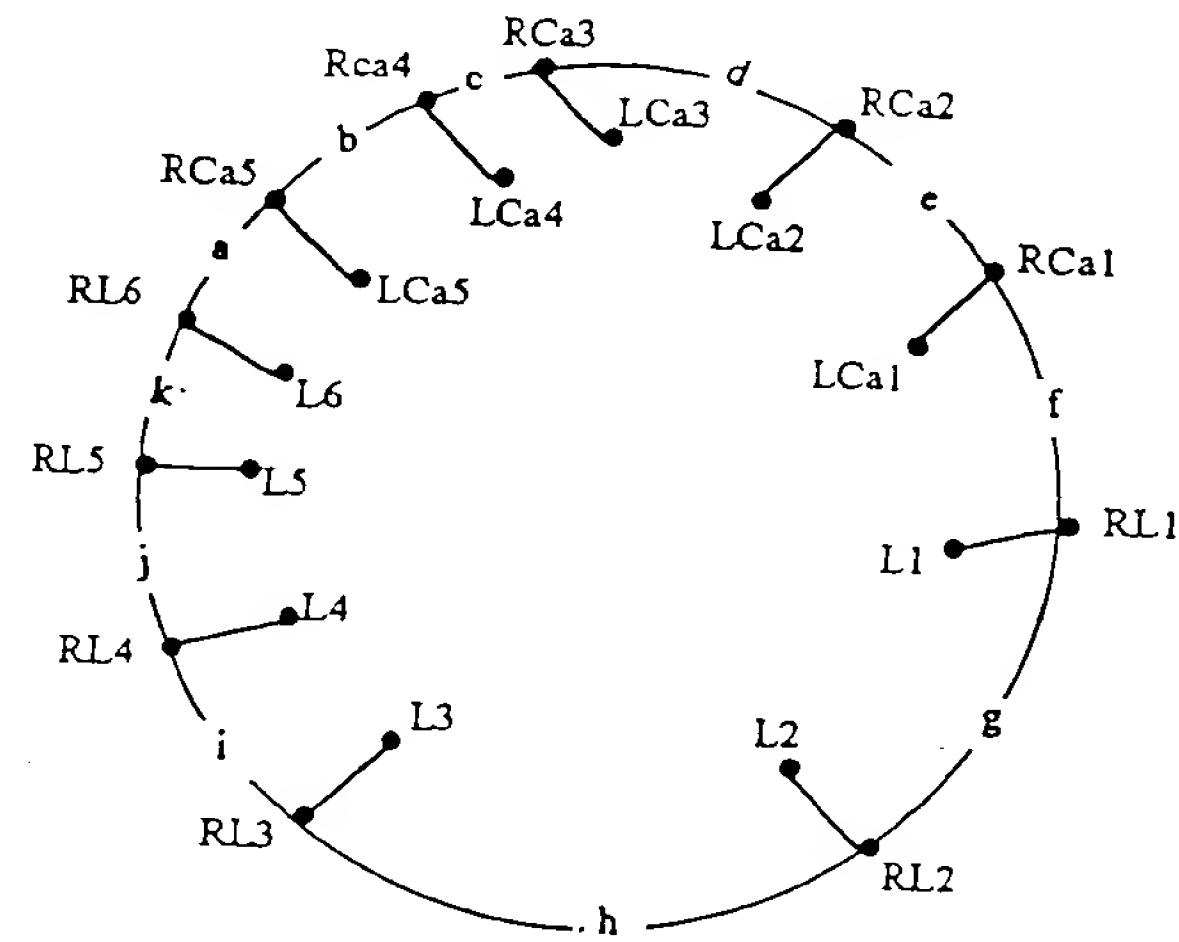
Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), RL1 à RL6 peuvent être

disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérales soient directement accessibles au phospholipide.

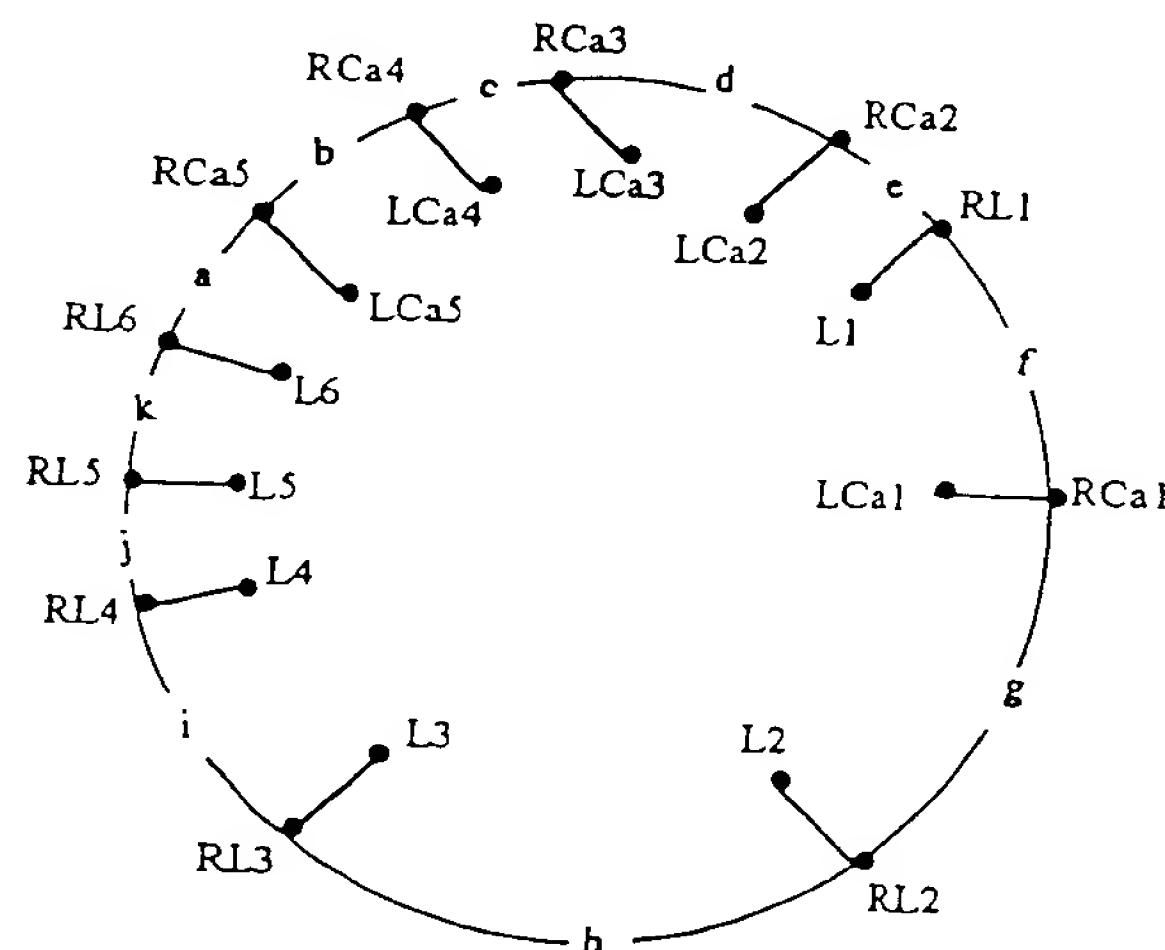
5 Selon l'invention, la structure de construction (I), (II) ou (III) peuvent comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

La présente invention fournit également une structure chimique qui est caractérisé en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCal, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :

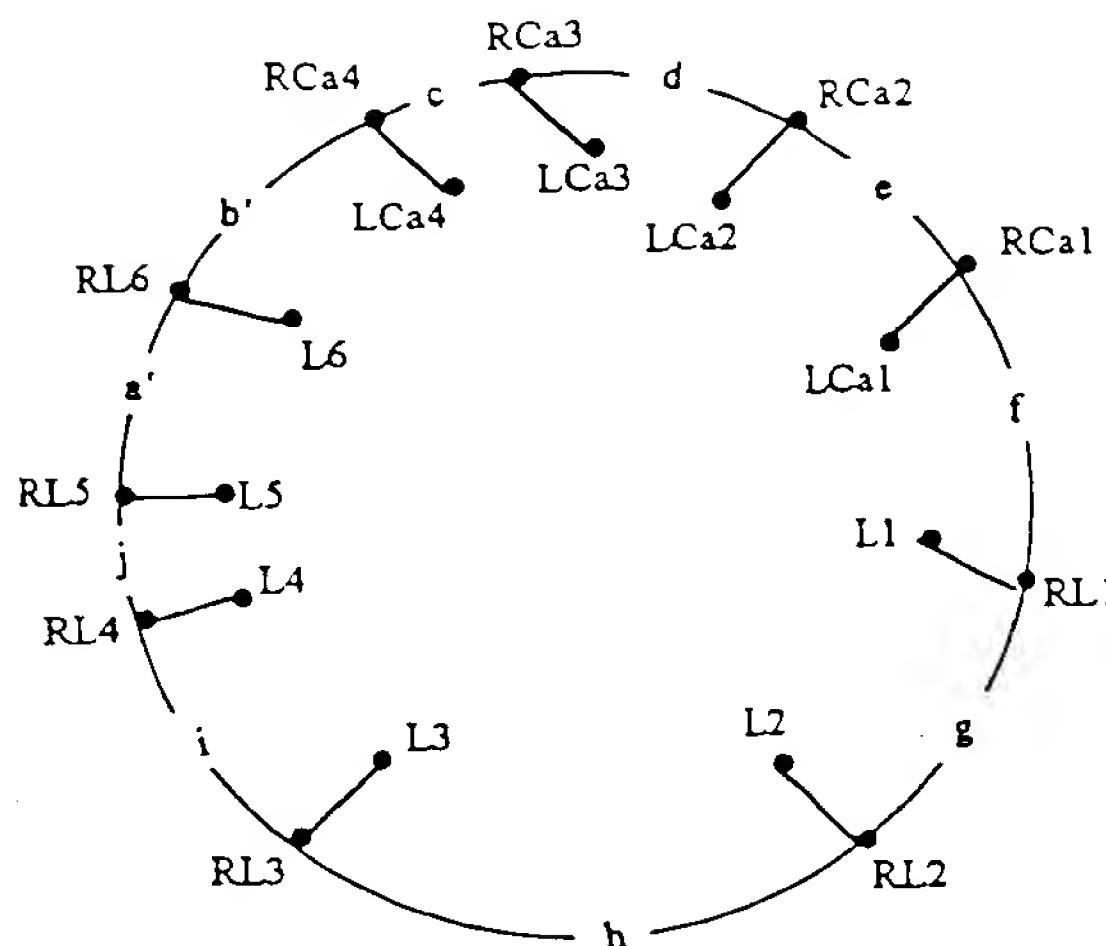
10



(IV)



(V)



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),
 dans lequel RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et
 dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à 0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est

tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm,
5 RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont
10 distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et
15 RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel
20 que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte au niveau de a et/ou de h.

25 Les plates-formes selon l'invention sont constituées d'un ensemble de groupes chimiques structuraux pouvant comprendre un nombre de groupes cycliques suffisants pour assurer une rigidité compatible avec l'affinité au phospholipide.

30 Les distances mesurées lorsque les RL et les RCa sont des acides aminés, peuvent être mesurées entre les carbones α de ces acides aminés dans les structures (I) à (VI) précitées.

Ces structures peuvent être synthétisées par les procédés classiques de synthèse de la chimie organique et de la chimie des protéines, par recombinaison génétique, par génie génétique, etc...

5 Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), L1, L2, L3 et L6 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 et LCal peuvent présenter chacune au 10 moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), RL1, RL2, RL3 et RL6 peuvent être choisis indépendamment 15 parmi Arg, Lys, Orn ; RL4 peut être choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 peut être choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipides L1 à 20 L6 respectivement.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et 25 RL1 à RL6 peuvent être des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCal à LCa5 peuvent être les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCal à RCa5 peuvent 30 être des acides aminés naturels ou non naturels.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), les carbones RL1 à RL6 et RCal à RCa2 peuvent être disposés dans l'espace

formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium lorsque ce dernier est lié aux fonctions de liaison 5 LCal à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), au moins une partie de la plate-forme peut être une partie 10 d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

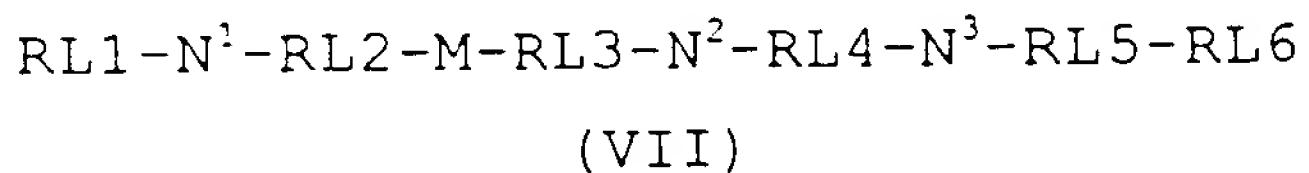
Selon l'invention, dans la structure de 15 construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), la plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, ladite partie du domaine de l'annexine comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites 20 fonctions L1 à L6 respectivement.

Selon l'invention, le domaine de l'annexine est choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté 25 sur la figure 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

Selon l'invention, les résidus ligands RL1 à RL6 peuvent être respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de 30 l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les résidus Lys100, Lys104, Lys138,

Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les 5 résidus Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide caractérisée en ce qu'elle comprend une 10 molécule de formule (VII) suivante :



15 dans laquelle N¹ à N³ représentent chacun indépendamment de 1 à 4 des acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un peptide constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;

20 dans laquelle RL₁, RL₂, RL₃ et RL₆ sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL₄ est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL₅ est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.

25 Selon l'invention, N¹ peut représenter trois acides aminés, N² peut représenter quatre acides aminés, et N³ peut représenter deux acides aminés dans la structure de formule VII.

Dans la structure selon l'invention, M peut être 30 par exemple un peptide constitué de 33 acides aminés naturels ou non naturels.

Selon l'invention, la structure de formule (VII) peut être une séquence peptidique choisie parmi la

séquence peptidique allant de Arg124 à Ser171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique 5 allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la séquence ID n°5 présentée sur la figure 6d, ou une 10 séquence modifiée de ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ;
RL4 choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

15 La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, comprenant au moins une partie d'une séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence ID n°2 20 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, et les séquences ID n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de celle-ci.

La présente invention fournit également une 25 structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement, comprenant une séquence peptidique cyclique de formule (VIII) suivante :

30
$$\text{Gly-RL1-Phe-RL2-P}^1\text{-Gly-Tyr-P}^2\text{-RL3-P}^3\text{-RL4-Q}^1\text{-RL5-Trp-RL6}$$

(VIII)

dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ; dans laquelle P¹, P² et P³ sont choisis indépendamment parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q¹ est choisi parmi Gly et Met.

Les structures chimiques précitées peuvent comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide chargé négativement. Le site calcium peut être par exemple un site calcium analogue à celui des annexines ou des phospholipides A2. Ces sites calcium sont connus par l'homme du métier.

Selon l'invention, toutes les structures chimiques précitées peuvent avoir une affinité pour un phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, une phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide, la ou les chaîne(s) lipide(s) des phospholipides peuvent par exemple comprendre de 4 à 23 atomes de carbone. Par exemple, le phospholipide peut posséder une chaîne d'acide arachidonique, par exemple pour la phosphatidylsérine.

La présente invention fournit également un assemblage chimique ayant une affinité pour un phospholipide, comprenant au moins deux des structures chimiques de la présente invention, identiques ou différentes, lesdites structures étant liées.

Par exemple, dans un assemblage chimique de la présente invention, au moins une des structures chimiques peut être une des structures chimiques peptidiques précédemment décrites.

Les assemblages selon l'invention peuvent donc être composés par exemple de structures identiques ou différentes. Par exemple, l'assemblage peut être un assemblage covalent convenable de deux structures selon 5 l'invention, par exemple des domaines 1 et 4 selon l'invention d'une même annexine. Cet assemblage peut par exemple comporter un domaine 4 selon l'invention modifié par génie génétique dans le but d'introduire un site calcium et phospholipidique identique à celui du 10 domaine 1 de l'invention.

Ces domaines peuvent par exemple provenir des annexines I et V.

Ces assemblages peuvent avoir notamment pour but d'augmenter l'affinité des structures de la présente 15 invention, pour le phospholipide, par exemple pour un phospholipide chargé négativement. Ils peuvent être réalisés par exemple par insertion d'un lien peptidique flexible, par exemple poly-glycine, entre les structures chimiques de l'invention.

Les structures et assemblages de la présente 20 invention présentent une affinité pour les phospholipides, et notamment pour ceux chargés négativement, meilleure que $0,1 \mu\text{M}$. Ils peuvent comprendre une partie d'une annexine ou l'un de ses 25 dérivés. Cette annexine peut être une annexine naturelle ou modifiée par les moyens classiques de la chimie ou du génie génétique.

La présente invention fournit également un procédé de fabrication d'une structure chimique comprenant les 30 étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte

appropriée pour une réPLICATION du plasmide et la fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

5 Selon l'invention, dans ce procédé, le vecteur peut être un plasmide, par exemple le vecteur pGEX-2T.

Dans le procédé selon l'invention, la cellule hôte appropriée peut être par exemple *E. Coli*.

Par exemple, pour la fabrication de la structure selon l'invention, on peut partir du domaine 1 de 10 l'annexine I et modifier la séquence de telle manière que les résidus RL définis précédemment et éventuellement les résidus RCa apparaissent dans la séquence. Ainsi, par des procédés classiques de génie 15 génétique, on peut fabriquer un cDNA codant pour la séquence modifiée et obtenir très facilement la structure de la présente invention. La structure selon l'invention, lorsqu'elle présente au moins une partie peptidique peut également être fabriquée par un procédé classique de synthèse chimique en phase solide.

20 Un exemple de modification de la séquence du domaine 1 de l'invention de l'annexine I peut consister à remplacer His52 par Arg, Met56 par Lys ou Arg, Val57 par Gly, Val60 par Tre, éventuellement Lys90 par Arg, Thr95 par Asp, Lys98 par Ser ou Thr, et Ala99 par Asp 25 ou Glu. Ces modifications peuvent être faites sur d'autres domaines également.

Ces modifications peuvent avoir notamment pour rôle d'augmenter la stabilité générale de la structure ou du domaine vis-à-vis de la température, du pH, et 30 des conditions ioniques du milieu d'utilisation ; de diminuer ses propriétés éventuelles de toxicité générale envers l'organisme humain ; d'augmenter son affinité pour les phospholipides chargés négativement ;

et d'augmenter son affinité générale pour les membranes cellulaires.

Selon l'invention, la modification d'un domaine peut également avoir pour rôle de développer l'affinité de la structure pour un phospholipide, par exemple chargé négativement ; et même de retrouver une affinité au moins égale à celle que possède l'annexine dite sauvage, en l'absence de calcium.

La modification peut par exemple porter sur le résidu dit résidu bidentate Asp ou Glu de calcium (RL6) du ou des domaines portant un site phosphatidylsérine, pour les remplacer par l'un des résidus Lys ou Orn.

Une autre modification, par exemple du domaine 1 de l'annexine V peut consister à remplacer Glu 72 par Lys ou Orn, et/ou Thr 33 par Lys ou Orn.

Selon l'invention, la structure chimique ou l'assemblage de la présente invention peut être utilisée pour préparer un médicament.

Par exemple, le médicament peut être choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

Selon l'invention, la structure ou l'assemblage chimique selon l'invention peut être couplé à une molécule de marquage pour former un composé de marquage.

Selon l'invention, la molécule de marquage peut être choisie par exemple parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

La présente invention fournit aussi une trousse de diagnostic comprenant une structure ou un assemblage précité.

Cette trousse de diagnostic peut par exemple comprendre en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

La présente invention fournit également une 5 trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention.

La présente invention fournit également une 10 trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention couplé à un marqueur.

15

D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront encore à la lecture des exemples illustratifs et non limitatifs qui suivent, en référence aux figures en annexe.

20

Brève description des figures

- la figure 1A est une représentation schématique de la structure générale des annexines ;
- la figure 1B est une représentation schématique 25 de la structure d'un domaine d'une annexine comportant un site calcium ;
- la figure 2 est un schéma illustrant l'insertion dans un vecteur PGEX-2T du cDNA codant pour la structure chimique de la présente invention pour produire ledit composé 30 par génie génétique ;
- la figure 3 est une représentation schématique d'un spectre RMN ^1H du domaine 1 de la présente

invention de l'annexine I présentant la région des aliphatiques ;

- la figure 4 est une représentation graphique de la dénaturation du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I par le chlorure de guanidinium ;
- la figure 5 est une représentation graphique de la dénaturation thermique du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I ;
- 10 - la figure 6a représente la séquence de l'annexine I, notée séquence ID n°1, dans laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;
- la figure 6b représente la séquence de l'annexine V, notée séquence ID n°2, dans laquelle la séquence du domaine 1 de la présente invention a été soulignée ;
- 15 - la figure 6c représente la séquence de l'annexine III, notée séquence ID n°3, dans laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;
- la figure 6d représente la séquence de l'annexine IV, notée séquence ID n°4 et séquence ID n°5, dans laquelle la séquence des domaines 1 et 2 de la présente invention ont été soulignées ;
- la figure 7 est une représentation schématique de la structure de construction (I) de la présente invention liée à une molécule de phosphatidylsérine mettant en évidence les interactions entre les fonctions de liaison L1 à L6 de la structure de construction (I) de

l'invention et une molécule de phosphatidylsérine ;

- la figure 8 est une représentation schématique des interactions entre les résidus ligands du 5 domaine 1 de la présente invention de l'annexine V humaine représenté sur la figure 6b, et une molécule de phosphatidylsérine en présence d'un atome de calcium.

10

EXEMPLES

Exemple 1 : Expression et purification des peptides de séquences ID n°1 et ID n°2 de la présente invention

Les séquences ID n°1 et ID n°2 des annexines I et 15 V ont été préparées par surexpression dans *E. Coli* selon le même protocole que celui qui a été décrit par F. Cordier-Ochsenbein et al. dans J. Mol. Biol. 279, 1177-1185.

Le cDNA de ces séquences d'annexines a été préparé 20 en utilisant la PCR à partir du cDNA des annexines correspondantes. Le cDNA a été inséré dans le vecteur pGEX-2T (Smith & Jonhson, 1998). La figure 2 est un schéma illustrant l'insertion du cDNA dans le vecteur. L'absence de mutations induites par la PCR a été 25 contrôlée par séquençage. La production du peptide est effectuée en utilisant la souche *E. Coli* BL21 contenant le vecteur d'expression décrit plus haut. Après induction par l'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG, 100 µm) jusqu'à une densité optique de 1 à 600 nm, la 30 poussée est continuée jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint, c'est-à-dire pendant environ 3 heures. Après centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans le tampon de lyse comprenant 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM

EDTA, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glycérol, 1% (v/v) Triton X100, 1 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 20 µg/ml aprotinine.

5 La purification a été effectuée de la façon suivante : après sonification et centrifugation à 10000 g, le surnageant contenant les protéines solubles est incubé avec des billes de glutathion/agarose permettant la liaison spécifique à ces billes de la protéine de fusion GST-domaine. Après lavage avec une solution contenant 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl à pH 8, 70 unités de thrombine par litre de culture sont ajoutés et la séquence est éluée.

10 La séquence est alors purifiée sur une colonne proRPC (marque de commerce) de type 16/10, fournie par la société Pharmacia en utilisant un système FPLC et un gradient linéaire d'eau de qualité Millipore (marque de commerce) contenant 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique TFA, et d'acetonitrile contenant 0,1% de TFA. La vitesse d'écoulement est ajustée à 2,5 ml/minute. La séquence est ensuite lyophilisée. Le rendement final est d'environ 8 mg de séquence par litre de culture.

15 25 Exemple 2 : Stabilité de la séquence ID n°1 de l'annexine 1

Différentes expériences montrent que cette séquence constitue une protéine de repliement stable.

20 La figure 3 montre un spectre 1D de RMN ¹H du proton de la séquence ID n°1 isolée de l'annexine 1, en solution aqueuse. La dispersion des fréquences de résonance et la présence de résonances à des déplacements chimiques inférieurs à 0 ppm indiquent

clairement que cette séquence est fortement structurée. De plus, les données de déplacement chimique des protons α révèlent la présence de 5 hélices conformément à la structure cristallographique.

5 La figure 4 montre la dénaturation coopérative du domaine 1 de l'annexine I issu de la séquence ID n°1 par le chlorure de guanidinium, qui est un dénaturant classique et la figure 5 montre la dénaturation coopérative de la séquence par la température.

10 Des données analogues sont obtenues pour les autres séquences décrites précédemment et démontrent que certaines séquences d'annexine se comportent comme de petites protéines de stabilité normale, utilisables directement, ou comme plate-forme, pour l'ingénierie de 15 composés fonctionnels nouveaux.

Exemple 3 : Rôle essentiel du domaine 1 de l'annexine V
issu de la séquence ID n°2 dans la liaison de l'annexine V aux membranes

20 Des expériences de liaison de l'annexine V à des systèmes membranaires modèles ainsi que des expériences d'inhibition de la protéine kinase C (PKC) *in vitro*, et de la phospholipase A₂ (PLA₂) cytoplasmique (cPLA₂) *in vivo* démontrent le rôle essentiel joué par le domaine 1 25 dans cette liaison aux membranes.

On prend ici comme exemple le cas de l'inhibition de la cPLA₂. L'inhibition de l'activité phospholipasique par l'annexine V résulte de la déplétion du substrat lipidique commun à ces deux 30 protéines. Divers mutants de l'annexine V ont été construits pour éliminer de façon sélective dans un ou plusieurs domaines la capacité de lier le calcium, c'est-à-dire les phospholipides. La mutation consiste à

remplacer le ligand bidentate du calcium, Glu ou Asp, d'une séquence de la présente invention par un résidu non liant, Gln ou Asn respectivement. Douze mutants ont ainsi été construits et purifiés : M1, M2, M3, M4, 5 M1M2, M1M3, M1M4, M2M3, M1M2M3, M1M2,M4, M2M3M4 et M1M2M3M4, le chiffre indiquant le domaine pour lequel la capacité de lier le calcium a été supprimée. L'ensemble des résultats montre que l'activité phospholipasique de la PLA₂ cellulaire, mesurée par le 10 taux de relargage d'acide arachidonique, dépend fortement de la présence du site calcium dans le domaine 1 et à un moindre degré dans le domaine 4. La suppression des sites calcium dans les domaines 2 et 3 n'a quasiment aucun effet sur l'inhibition de 15 l'activité phospholipasique de la cPLA₂. (Mira et al. J. Biol. Chem. 1997, 272:10474-10482 ; Dubois et al. Biochem. J. 1998, 330:1277-1282).

Le tableau (I) suivant regroupe certains résultats de cet exemple, et montre le pourcentage de diminution 20 de la liaison des mutants de l'annexine V aux phospholipides par rapport à l'annexine V sauvage.

Annexine V sauvage	M1	M2	M3	M4	M1M2M3	M1M2M2
0	79 ₋₆	38 ₋₄	47 ₋₉	38 ₋₆	98 ₋₁	85 ₋₇

Ce tableau (I) montre la liaison aux membranes de 25 l'annexine V et de ses mutants M1, M2, M3, M4, M1M2M3 et M1M2M4. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution de la capacité de liaison par rapport à l'annexine V sauvage (valeur moyenne \pm erreur standard). Pour les mutants M123 et M124, le taux de 30 liaison résiduel n'est pas significatif.

Exemple 4 : Utilisation de la structure chimique de la présente invention

Trois voies d'utilisation sont prévues : i) simple ingénierie des domaines pour satisfaire aux diverses 5 exigences liées à leur utilisation comme outils de recherche, de diagnostic et de thérapeutique ; ii) "re-design" de la plate-forme qui constitue la topologie du domaine en une nouvelle plate-forme plus simple et synthétisable par voie chimique ou par génie 10 génétique ; iii) remplacement de la plate-forme peptidique ou peptoidique par une structure organique non-peptidique pour la fabrication d'un médicament. Dans les trois cas, il s'agit naturellement de conserver, voire d'améliorer, la localisation spatiale 15 des fonctions de liaison avec les phospholipides, décrits plus haut.

1) Ingénierie des domaines d'annexines

Les domaines d'annexines de la présente invention 20 constituent des plates-formes peptidiques. On entend par ingénierie la modification de la séquence des domaines par mutagénèse afin d'améliorer la stabilité générale de la molécule et de l'adapter aux conditions physico-chimiques imposées par l'utilisation, 25 d'améliorer son affinité pour le ligand phospholipidique, et lui conférer une spécificité propre à chaque phospholipide. Il s'agit aussi de permettre l'introduction de différents marqueurs pour les différentes applications dont il est question plus 30 loin. Nos connaissances actuelles sont largement suffisantes pour effectuer une telle ingénierie.

Les exemples d'un changement de propriété ont été illustrés dans l'exemple 4. Ils ont été obtenus par une

technique classique de génie génétique en mutant les acides aminés impliquées.

2) "Re-design" des plates-formes peptidiques

Le "re-design" de la plate-forme consiste à redéfinir une architecture moléculaire, tout en gardant la topologie convenable des résidus impliqués dans la liaison au calcium et aux phospholipides. L'intérêt du "re-design" est de créer une plate-forme de séquence plus courte pouvant être produite par synthèse chimique. La synthèse d'un peptide de la taille d'un domaine est possible mais reste difficile. La réduction par deux du nombre de résidus, soit environ 35 résidus, rend par contre la synthèse couramment réalisable. Dans cette opération de "re-design", on conserve assez précisément la géométrie permettant des interactions avec le phospholipide, et notamment la disposition des résidus de la séquence annexine. Ces résidus sont ceux indiqués en gras sur les figures 6a à 6d pour les annexines (I) à (V).

Cet ensemble comprend deux résidus basiques, généralement Arg-x-x-x-Lys, à la fin de l'hélice A du domaine concerné et une série de résidus acides, basiques et neutres, généralement Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp, situés dans l'hélice D. L'étude de la structure moléculaire montre, figures 7 et 8, que ces résidus sont parfaitement disposés pour lier une molécule de phosphatidylsérine. Le groupe carboxylate de ce lipide est lui-même lié à l'atome de calcium situé dans la boucle AB et désigné dans la suite par "site calcium AB".

La séquence :

Arg-x-x-x-Lys (hélice A) ---- **Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp** (hélice D)

5 associée à celle du site calcium AB, constitue donc une séquence consensus pour la liaison de la phosphatidylsérine dans les composés de la présente invention. Pour généraliser, on désignera maintenant cette séquence par :

10

RL1-x-x-x-RL2----RL3-x-x-x-x-RL4-x-x-RL5-RL6

où RL1 à RL6 sont les résidus ligands essentiels dans la liaison de la phosphatidylsérine indiqués en gras 15 dans les séquences des figures 6a à 6d et indiqué dans les composés de structure (I) à (VI). La séquence consensus du site calcium AB est la suite :

Met-Lys-Gly-x-Gly-Thr----Asp (ou Glu)

20

Les ligands du calcium sont les groupes carboxyl peptidiques des résidus en italique (résidus de la boucle AB) sur la figure et les deux atomes d'oxygène du groupe carboxylate de la chaîne latérale du résidu 25 Asp (ou Glu) de la fin de l'hélice D, dénommé aussi ligand bidentate. En généralisant ces ligands du calcium seront maintenant désignés par :

RCa1-RL2-RCa2-x-RCa3-Thr----(RCa4RCa5) ou **RL6**

30

Dans le cas de l'annexine, RCa4 et RCa5 constituent un seul et même résidu déjà identifié précédemment comme RL6.

Les données de distances interatomiques entre les résidus ligands sont donnés dans le tableau (II) suivant en référence à la figure 7 en annexe et les interactions précises domaine-calcium-phosphatidylsérine sont indiquées dans le tableau (III) suivant en référence à la figure 8 en annexe.

Sur la figure 8, Ch1 et Ch2 représentent la position d'éventuelles chaînes carbonnées du phospholipide. Ces chaînes peuvent être celles décrites, par exemple l'acide arachidonique.

Selon l'invention, la structure chimique peut être constituée de la façon suivante :

a) elle comporte en particulier au moins 6 résidus, dits résidus ligands, nommés RL1 à RL6 et dont la nature est la suivante :

RL1 = Arg ou Lys ou Orn
RL2 = Arg ou Lys ou Orn
RL3 = Arg ou Lys ou Orn
RL4 = Asp ou Glu
20 RL5 = Ser ou Thr ou Asp ou Glu
RL6 = Arg ou Lys ou Orn

b) les carbones α des résidus ligands RL1 à RL6 sont disposés dans l'espace de manière à ce que les chaînes latérales soient directement accessibles aux phospholipides,

c) les carbones α des résidus ligands RL1 à RL6 sont disposés selon le tableau II de distances suivant :

Carbone α	RL2	RL3	RL4	RL5	RL6
RL1	0,45 à 0,65	0,7 à 1,2	0,7 à 1,0	0,85 à 1,15	0,65 à 0,95
RL2		0,5 à 1,05	0,8 à 1,2	1,2 à 1,7	0,9 à 1,4
RL3			0,5 à 0,8	1,0 à 1,3	1,2 à 1,7
RL4				0,45 à 0,75	0,7 à 1,2
RL5					0,4 à 1,2

d) les chaînes latérales des résidus ligands RL1 à LR6 permettent d'établir un réseau de liaisons hydrogène avec la phosphatidylsérine selon le schéma où les flèches ----- désignent au moins une liaison hydrogène, figure 8, dans le sens donneur vers accepteur et L1 à L6 désignent les ligands de la phosphatidylsérine selon la liste suivante :

- 10 L1 = NZLYs ou CZArg de LR1
- L2 = NZLys ou CZArg de LR2
- L3 = NZLys ou CZArg de LR3
- L4 = CGAsp ou CDGlu de LR4
- L5 = CB de Ser ou Thr ou CG de Asp ou CD de Glu de LR5
- 15 L6 = NZLys ou CZArg de LR6

HN = H

NZ = N zeta

CZ = C zeta

20 OD = O delta

OG = O gamma

OE = O epsilon

où les distances entre les ligands L1 à L6 et les atomes de la phosphatidylsérine sont données dans le tableau III suivant :

5 Distances nm x 10

	N	C β	C γ	O1	O2	O3	O4	Cl chaîne Ch1	Cl chaîne Ch2
L1	0,35 à 0,65	0,3 à 0,5	0,25 à 0,45	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,35 à 0,6	0,2 à 0,35	0,4 à 0,7	0,5 à 0,8
L2	0,55 à 0,85	0,45 à 0,75	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,4 à 0,6	0,25 à 0,45	0,7 à 1,1	0,7 à 1,1
L3	0,4 à 0,6	0,4 à 0,6	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,7 à 1,1	0,6 à 1,0
L4	0,25 à 0,45	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,55 à 0,85	0,5 à 0,75	0,4 à 0,65	0,4 à 0,6	0,8 à 1,2	0,8 à 1,2
L5	0,25 à 0,5	0,45 à 0,65	0,5 à 0,75	0,65 à 0,95	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,5 à 0,9	0,8 à 1,2	0,6 à 1,0
L6	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,3 à 0,45	0,65 à 0,95	0,7 à 1,0	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,6 à 1,0	0,8 à 1,2

Pour le ligand L1, deux au moins des cinq distances indiquées dans ce tableau sont de préférence respectées.

3) Plate-forme organique

La troisième étape constitue l'étape ultime pour l'obtention d'un médicament facilement utilisable par voie orale. Il s'agit du remplacement de la plate-forme peptidique par une structure organique respectant la disposition spatiale des ligands phospholipidiques. Les ligands calciques et phospholipidiques ne sont plus des

résidus aminoacides mais des fonctions chimiques reproduisant les interactions décrites plus haut.

Les structures organiques couramment utilisées en pharmacologie peuvent permettre de construire des plates-formes rigides capables de présenter un site de liaison pour le phospholipide selon l'invention. Ces structures peuvent être constituées par les techniques chimiques classiques connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas nécessaire ici de rappeler.

10

Exemple 5 :

De manière très avantageuse, l'utilisation d'une structure ou d'un assemblage de la présente invention peut se faire comme indiqué précédemment dans trois directions : recherche, diagnostic et thérapeutique.

1) la recherche

Pour ces expériences, il convient de coupler une structure de la présente invention à une molécule de marquage permettant une détection. Ces molécules de marquage peuvent être celles précitées par exemple des molécules fluorescentes, un système avidine-biotine, des radioéléments, et de manière générale, celles couramment utilisées.

25

2) le diagnostic

Les structures chimiques et assemblages de la présente invention peuvent comme indiqué précédemment être utilisés pour la détection "in vitro" de pathologies impliquant l'apparition de charges négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules : par exemple les

troubles de la coagulation, les pathologies inflammatoires aiguës, etc...

Ils peuvent aussi être couplés à des radioéléments à vie courte et détection "in vivo" de la localisation 5 des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant des systèmes d'imagerie.

Ils peuvent aussi être couplés à des composés paramagnétiques, par exemple un complexe de gadolinium, 10 et détection "in vivo" de la localisation des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les couplages précités peuvent être réalisés par 15 les techniques classiques de chimie organique connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas utile ici de rappeler.

3) le médicament

20 Les structures et assemblages de la présente invention peuvent être utilisés en tant que tels pour fabriquer un médicament utilisable pour un traitement ou pour une prophylaxie car ils possèdent des propriétés anticoagulante, antithrombolytique et anti-inflammatoire intrinsèques.

Les assemblages selon l'invention permettent d'effectuer un tapissage des surfaces cellulaires, capable d'interdire l'accès de composés impliqués dans les étapes primaires de la coagulation sanguine et les 30 phénomènes inflammatoires à ces surfaces.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour le

ciblage de molécules à un site du thrombus, de l'inflammation, ou vers une zone tumorale.

Dans cette utilisation, les structures et assemblages de la présente invention sont couplés à une molécule qui a une action thrombolytique, à une molécule qui a une action anti-inflammatoire, ou à une molécule qui a une action anti-tumorale respectivement.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent donc être utilisés par exemple pour fabriquer un médicament utilisable dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose. Le couplage des structures et assemblages à des molécules à action thrombolytique permet un ciblage de ces dernières vers les zones thrombogènes. Les molécules thrombolytiques telles que les streptokinases, les urokinases, et les activateurs du plasminogène peuvent être utilisées.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une molécule ayant une action anti-inflammatoire pour fabriquer un médicament utilisable par exemple par voie locale ou par voie orale dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la RCH, le Crohn, le choc septique, les maladies du collagène et l'arthrite.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une molécule ayant une action antitumorale. Ce couplage permet de cibler ces dernières molécules vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs possédant des foyers cellules apoptotiques, des tumeurs inflammatoires, etc...

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour fabriquer un matériau de recouvrement de biomatériaux

susceptibles d'être thrombogènes. Un biomatériau thrombogène ainsi recouvert perd ses propriétés thrombogènes. Le biomatériau thrombogène peut être par exemple une valve cardiaque.

5 L'invention propose d'utiliser une structure chimique dérivée des protéines de la famille des annexines et leurs domaines isolés, modifiés ou non, capables de se lier réversiblement aux effecteurs lipidiques tel que les phosphatidylsérines, les acides phosphatidiques, les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylinositophosphates. Il s'agit de fournir un ensemble de composés protéiques, peptidiques, peptoïdes et organiques dont la propriété principale est de reconnaître spécifiquement l'apparition des signaux 10 lipidiques à la surface des membranes cellulaires en relation avec le fonctionnement normal ou pathologique des tissus. Les pathologies spécialement visées par l'invention sont : (i) les troubles de la coagulation 15 sanguine, (ii) les phénomènes d'apoptose consécutifs à l'action de composés chimiques, d'effets physiques comme les radiations ionisantes, d'effets biologiques 20 comme ceux liés à la formation ou la nécrose des tissus cancéreux, outre les phénomènes normaux d'apoptose, (iii) les pathologies inflammatoires aiguës et (iv) les 25 troubles associés aux relations entre les cellules et la matrice extra-cellulaire et notamment le collagène.

Outre l'ingénierie complète des annexines entières, un des aspects de l'invention est l'utilisation de domaines et de modules covalents 30 d'annexines soit directement soit comme plate-forme pour l'ingénierie de composés peptidiques fonctionnels. Il s'agit donc d'utiliser ces domaines et modules soit sous leur forme naturelle, soit modifiés par les voies

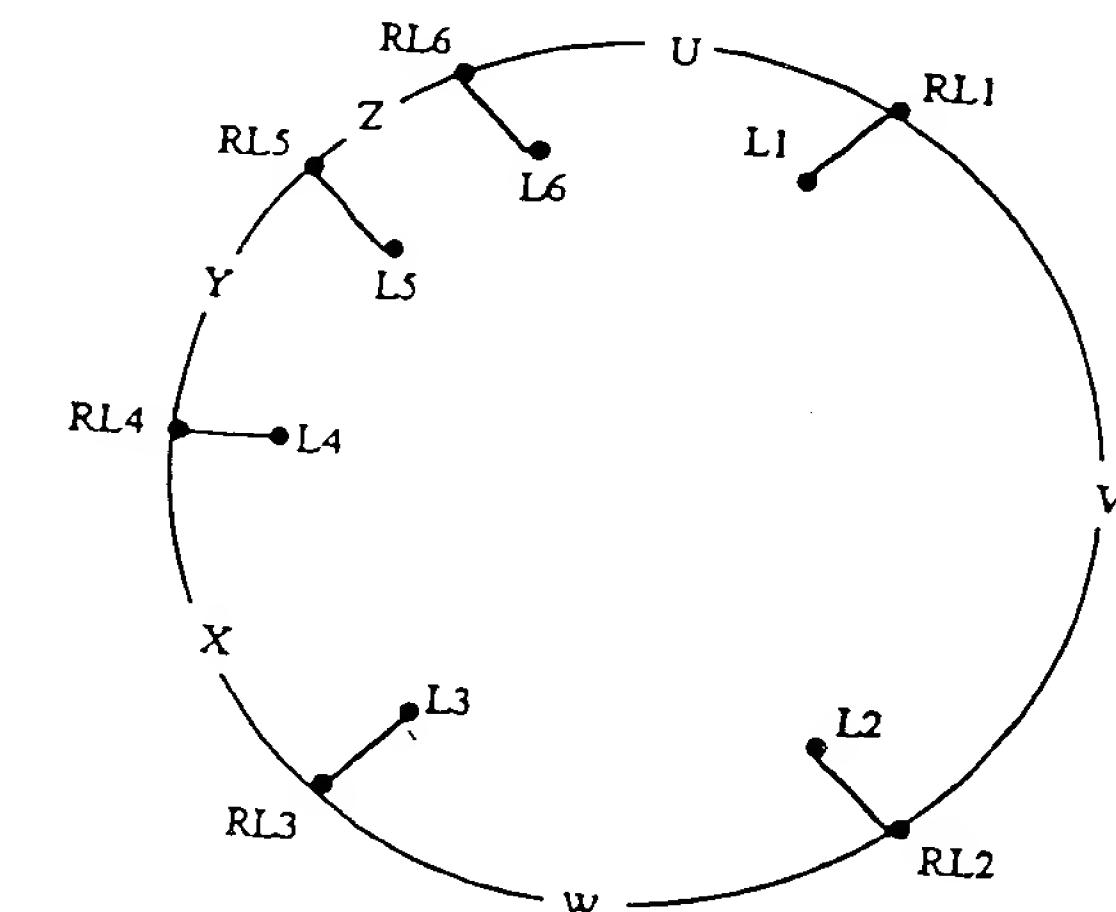
de la mutagénèse ou de la chimie, pour en faire des composés répondant aux critères biologiques exposés dans le paragraphe précédent.

De par leur faible taille, ces domaines peuvent 5 être facilement associés à d'autres protéines soit pour former des protéines chimères multifonctionnelles, soit pour introduire un mécanisme de régulation par des effecteurs autres que les phospholipides de signalisation. De plus, l'invention se propose de 10 redéfinir, par les méthodes de l'ingénierie des protéines, la spécificité des domaines pour les différents lipides de signalisation évoqués plus haut.

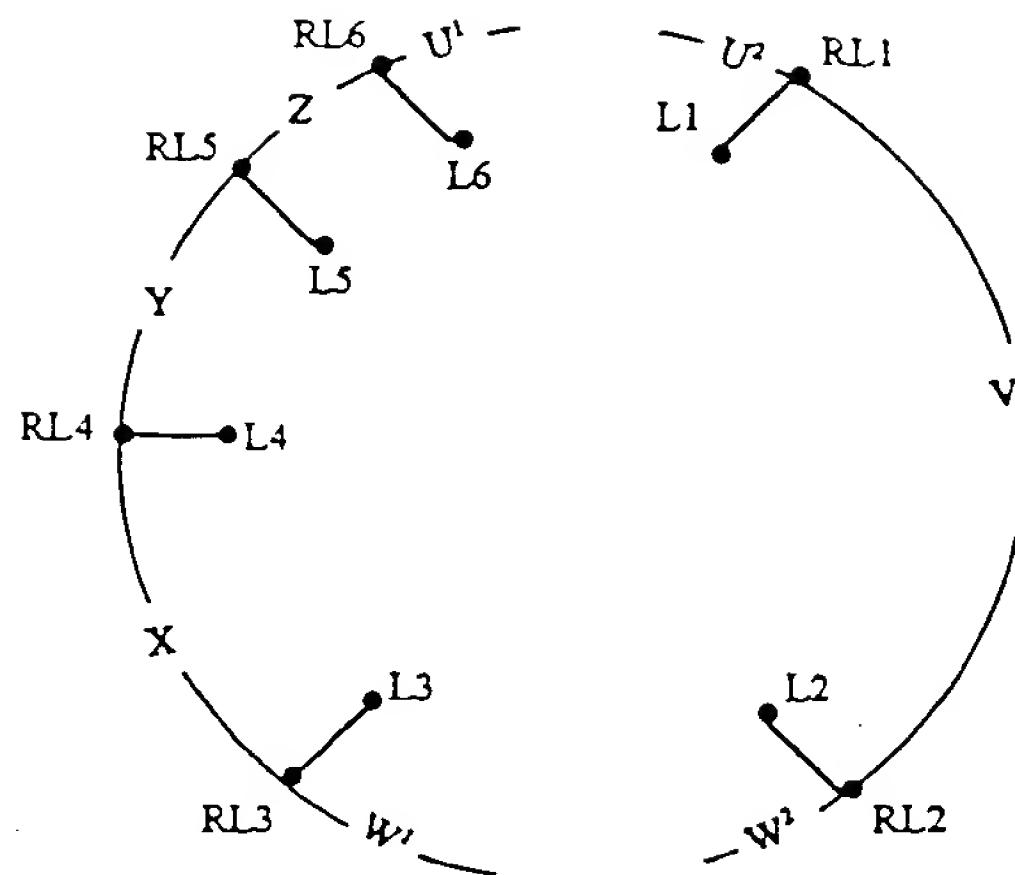
L'invention propose enfin de reconstruire ces domaines, par de *novo design*, pour en faire des 15 composés de taille plus restreinte et accessible à la synthèse peptidique et en particulier à l'introduction de résidus aminoacides non naturels dans le but d'augmenter la durée de vie de ces composés dans l'organisme.

REVENDICATIONS

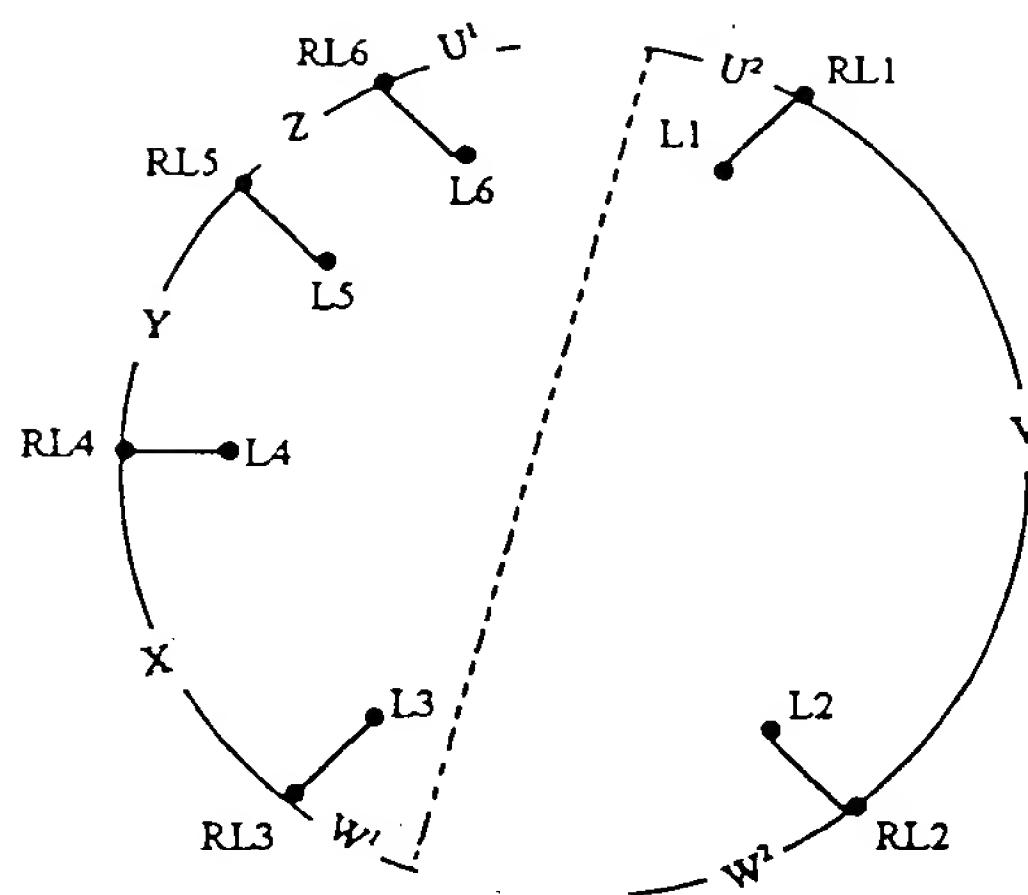
1. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces fonctions chimiques L définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :



(I)



(II)



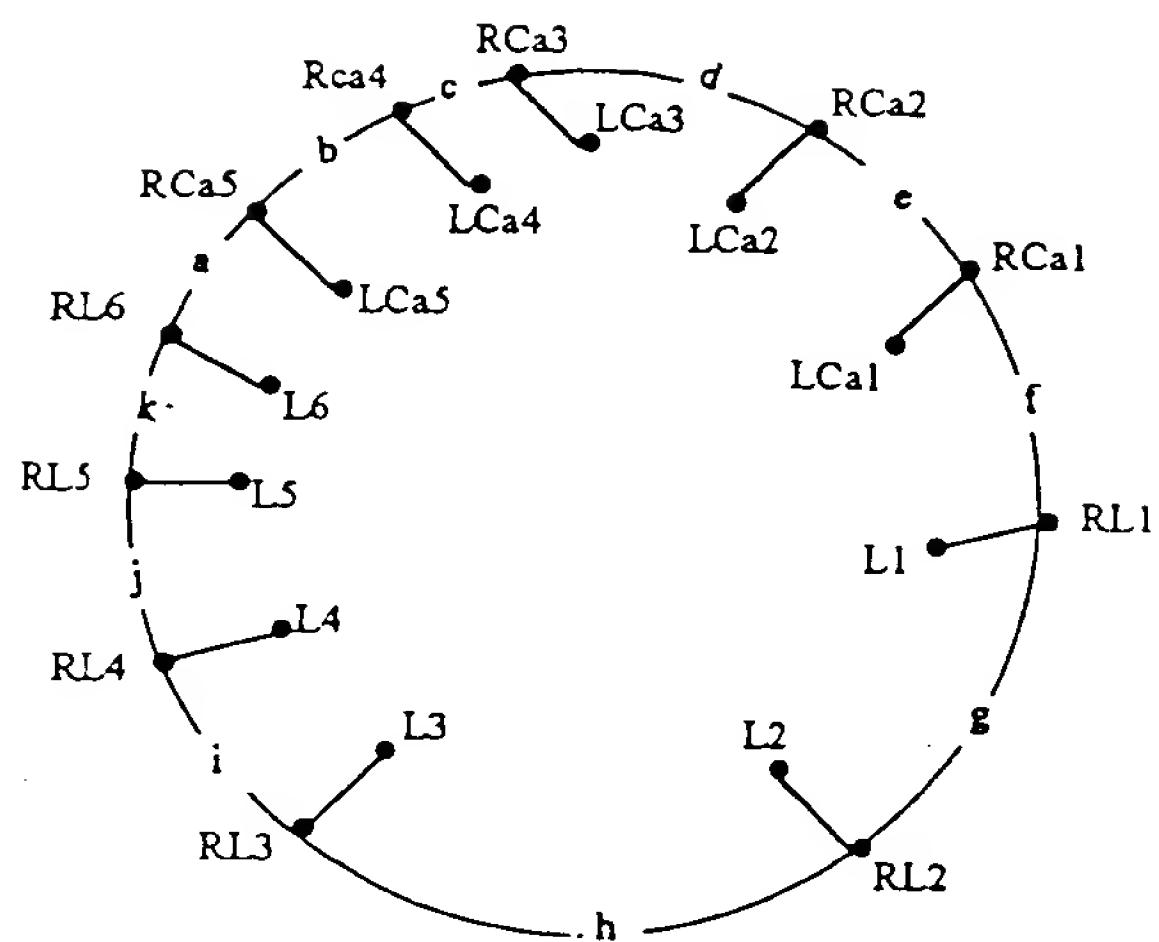
(III)

5

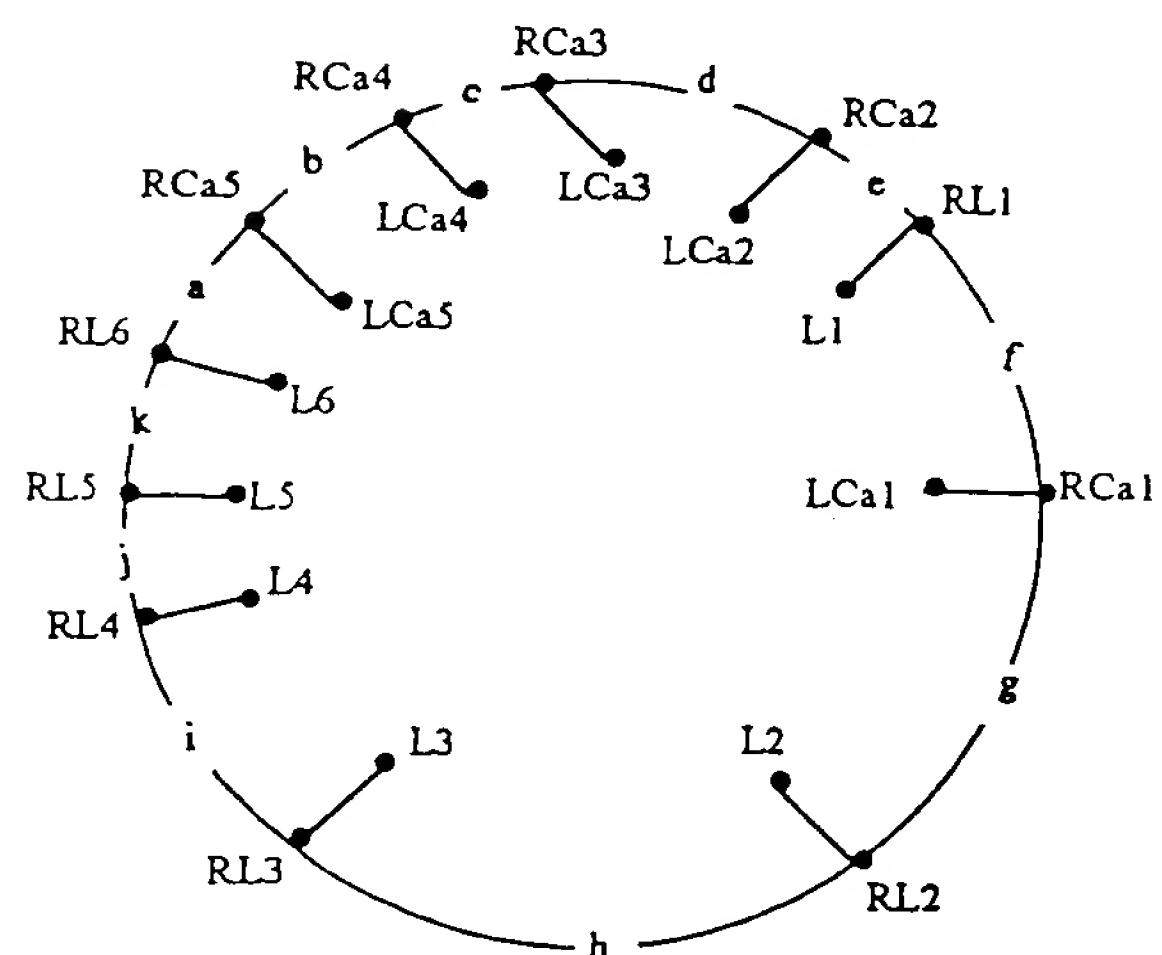
dans lesquelles U, U^1 , U^2 , V, W, W^1 , W^2 , X, Y, Z sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),

dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et dans lesquelles U, U¹, U², V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

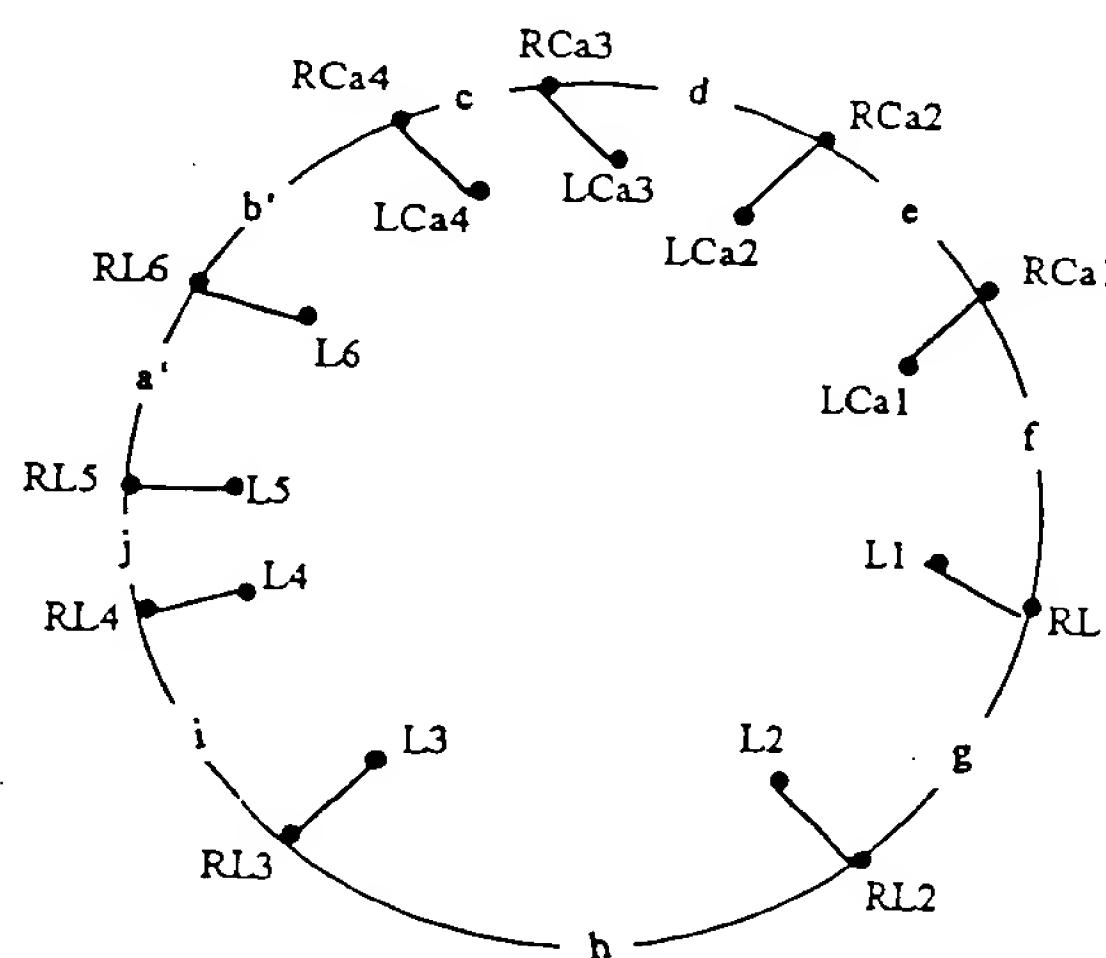
2. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :



(IV)



(V)



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j,
 k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non
 5 naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels
 ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des
 groupes(s) cyclique(s) carboné(s),
 dans lesquelles RL1 à RL6 et RCal à RCa5 sont choisis
 10 parmi des molécules présentant les fonctions chimiques
 de liaison L1 à L6 et LCal à LCa5 respectivement,
 lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au
 moins une charge positive et donneuse de liaison
 hydrogène, soit au moins une charge négative et
 acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions
 15 chimiques LCal à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et
 dans lesquelles a dans les structures de construction
 (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0
 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à
 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et
 20 (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à
 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à
 0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est

tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm,
5 RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont
10 distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et
15 RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel
20 que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte en a et/ou en h.

25

3. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacun au moins une charge positive et donneuse de liaisons hydrogène, et L4 et L5 présentent chacun au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.
30

4. Structure chimique selon la revendication 2, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacune au

moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1 présentent chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

5

5. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle U, V, W, X, Y et Z sont des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés.

15

6. Structure chimique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Arg, Lys, Orn, dans laquelle RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et

20 dans laquelle RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipide L1 à L6 respectivement.

25

7. Structure chimique selon la revendication 3 ou 4, dans laquelle RL1 à RL6 sont disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérale soient directement accessibles 30 au phospholipide chargé négativement.

8. Structure chimique selon la revendication 1, comprenant en outre un site calcium où l'ion calcium

complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

9. Structure chimique selon la revendication 2,
5 dans laquelle a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j,
k sont des peptides constitués d'acides aminés naturels
ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés
choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser,
Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6
10 et LCal à LCa5 étant les fonctions chargées des chaînes
latérales desdits acides aminés, et RCal à RCa5 étant
des acides aminés naturels ou non naturels.

10. Structure chimique selon la revendication 8,
15 dans laquelle RL1 à RL6 et RCal à RCa2 sont disposés
dans l'espace formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et
k de manière à ce que les fonctions chimiques de
liaisons L1 à L6 respectivement et les charges
positives du calcium lorsqu'il est lié aux fonctions de
20 liaison LCal à LCa5 soient directement accessibles au
phospholipide.

11. Structure chimique selon l'une quelconque des
revendications précédentes, dans laquelle au moins une
25 partie de la plate-forme est une partie d'un domaine de
l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine,
comportant au moins un desdits résidus ligands RL1 à
RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6
respectivement de liaison au phospholipide.

30

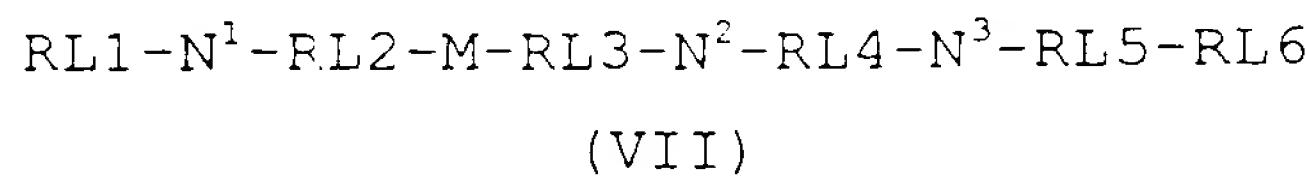
12. Structure chimique selon l'une quelconque des
revendications 1 à 10, dans laquelle la plate-forme est
une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine

modifié de l'annexine, comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement.

5 13. Structure chimique selon la revendication 12, dans laquelle le domaine de l'annexine est choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 10 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

14. Structure chimique selon la revendication 13, dans laquelle les résidus ligands RL1 à RL6 sont 15 respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les 20 résidus Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les résidus Arg24, 25 Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

15. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend une 30 molécule de formule (VII) suivante :



dans laquelle N¹ à N³ représentent chacun indépendamment de 1 à 4 acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un peptide 5 constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;

dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi 10 indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.

16. Structure selon la revendication 15, dans laquelle N¹ représente trois acides aminés, N² 15 représente quatre acides aminés, et N³ représente deux acides aminés.

17. Structure selon la revendication 15 ou 16, dans laquelle M est un peptide constitué de 33 acides 20 aminés naturels ou non naturels.

18. Structure selon la revendication 15, dans laquelle la molécule de formule (VII) est une séquence peptidique choisie parmi la séquence peptidique allant 25 de Arg124 à Ser171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure 30 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la séquence ID n°5 présentée sur la figure 6, ou une séquence modifiée de

ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient choisies indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn, RL4 soit choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 soit choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

5

19. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la 10 séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c et les séquences ID n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de celle-ci.

15

20. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence peptidique cyclique de formule (VIII) suivante :

20

Gly-RL1-Phe-RL2-P¹-Gly-Tyr-P²-RL3-P³-RL4-Q¹-RL5-Trp-RL6

dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ; 25 dans laquelle P¹, P² et P³ sont choisis indépendamment parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q¹ est choisi parmi Gly et Met.

30

21. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, comprenant en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide chargé négativement.

22. Structure selon l'une quelconque des revendications précédentes, ladite structure ayant une affinité pour un phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, un 5 phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide.

23. Assemblage chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux structures chimiques définies dans les revendications 1 à 22, identiques ou différentes, lesdites structures étant liées.

24. Assemblage chimique selon la revendication 23, dans lequel au moins une des structures chimiques est une des structures chimiques définies dans les revendications 15 à 22.

25. Procédé de fabrication d'une structure chimique définie dans l'une quelconque des revendications 11 à 22 précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur 25 d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte appropriée pour une réPLICATION du plasmide et la fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

30 26. Procédé selon la revendication 25, dans lequel le vecteur est un plasmide.

27. Procédé selon la revendication 25, dans lequel le vecteur est le vecteur pGEX-2T.

28. Procédé selon la revendication 25, 26 ou 27,
5 dans lequel la cellule hôte appropriée est *E. Coli*.

29. Utilisation d'une structure chimique telle que définie dans les revendications 1 à 22 pour préparer un médicament.

10

30. Utilisation d'un assemblage chimique tel que défini dans la revendication 23 ou 24 pour préparer un médicament.

15

31. Utilisation selon la revendication 29 ou 30, dans laquelle le médicament est choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

20

32. Utilisation d'une structure telle que définie dans les revendications 1 à 21 pour la fabrication d'un matériau de recouvrement d'un biomatériau thrombogène.

25

33. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend une structure telle que définie dans les revendications 1 à 22 couplée à une molécule de marquage.

30

34. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend un assemblage tel que défini dans la revendication 23 ou 24 couplé à une molécule de marquage.

35. Composé selon la revendication 33 ou 34 dans lequel la molécule de marquage est choisie parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

36. Trousse de diagnostic comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 33 à 35.

10 37. Trousse de diagnostic selon la revendication 35, comprenant en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

15 38. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

20 39. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

25 40. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

30 41. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

35. Composé selon la revendication 33 ou 34 dans lequel la molécule de marquage est choisie parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

5

36. Trousse de diagnostic comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 33 à 35.

37. Trousse de diagnostic selon la revendication 10 36, comprenant en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

15 38. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

20 39. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

25 40. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

30 41. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

FIG. 1B

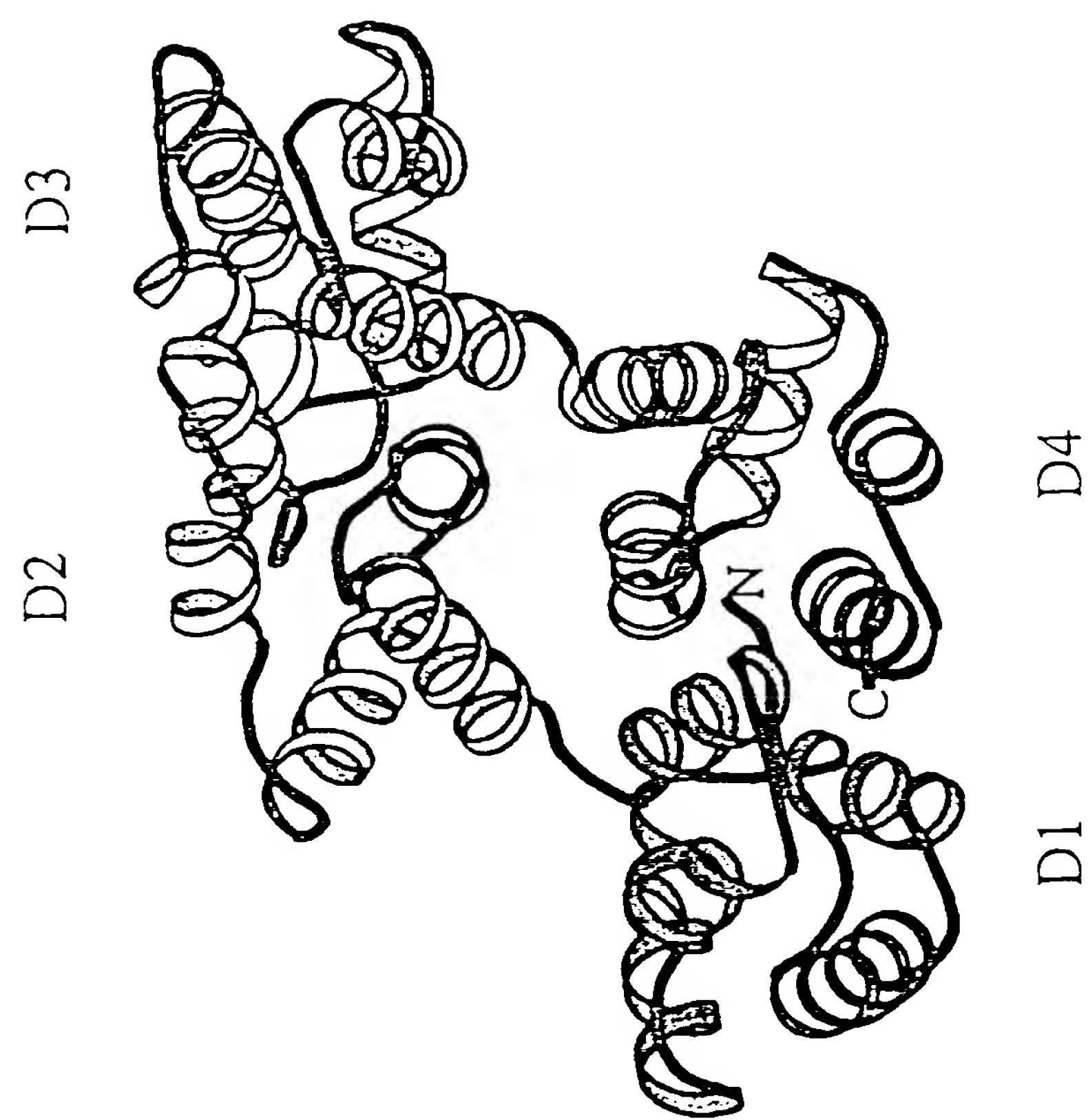
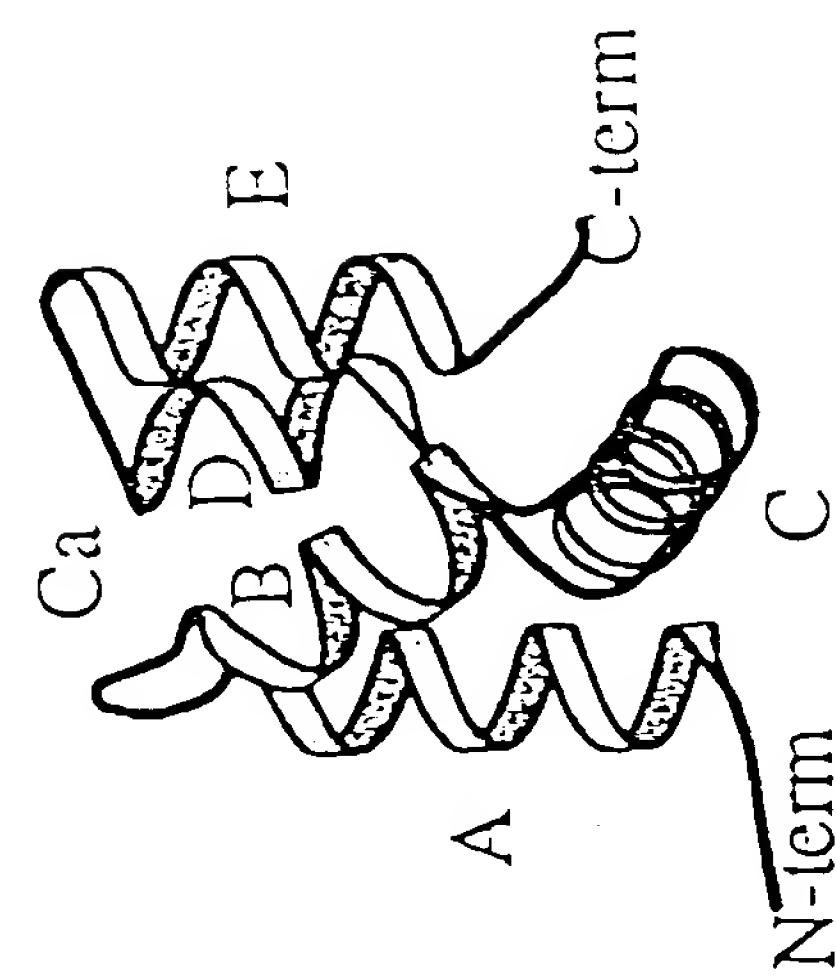
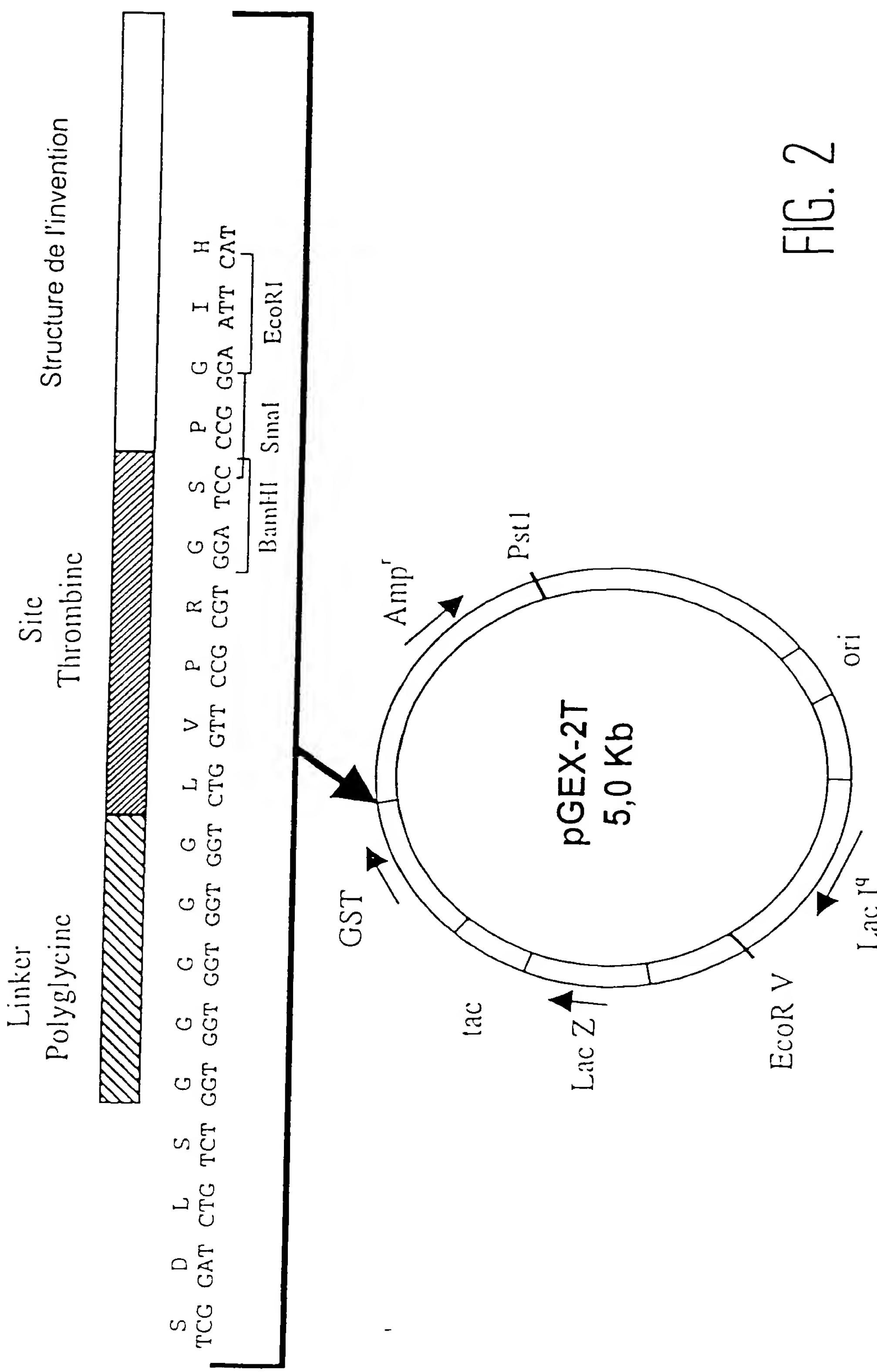


FIG. 1A

FIG. 2



3 / 9

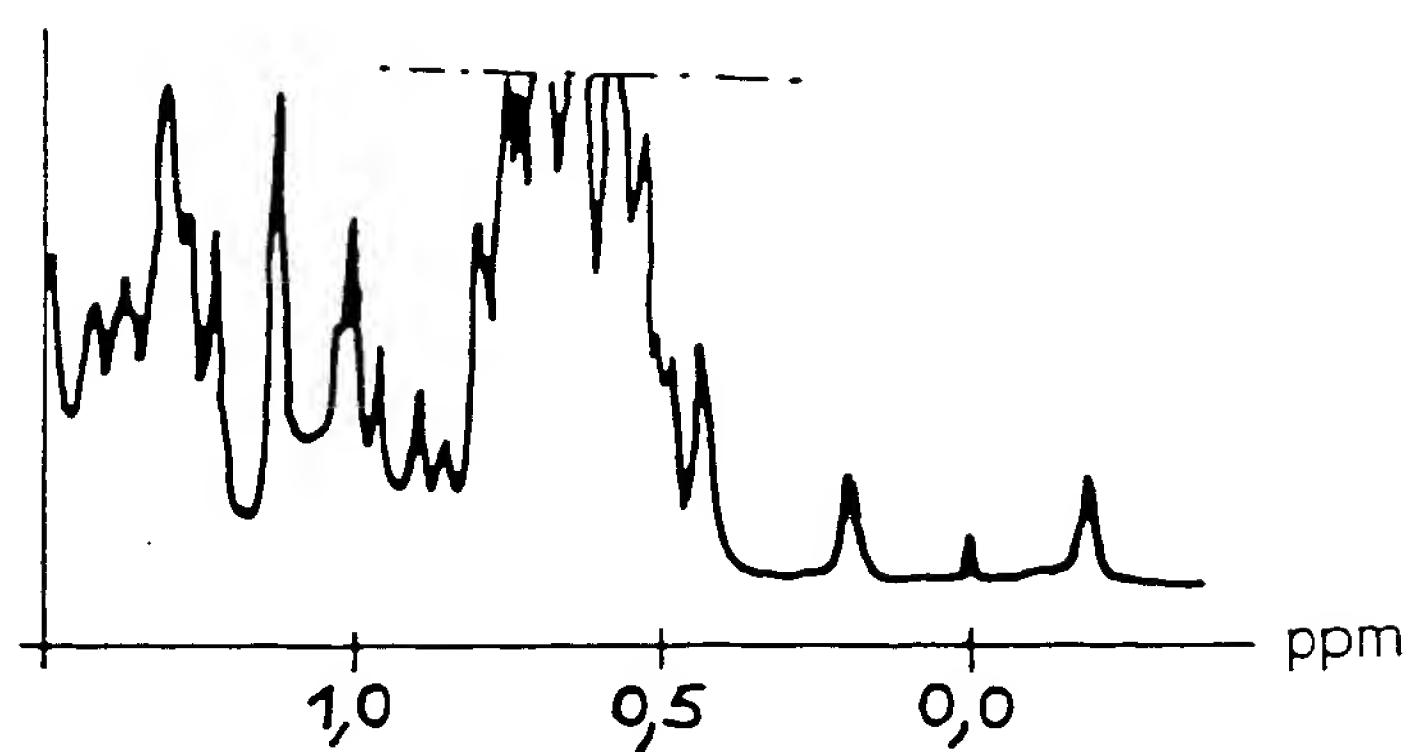


FIG. 3

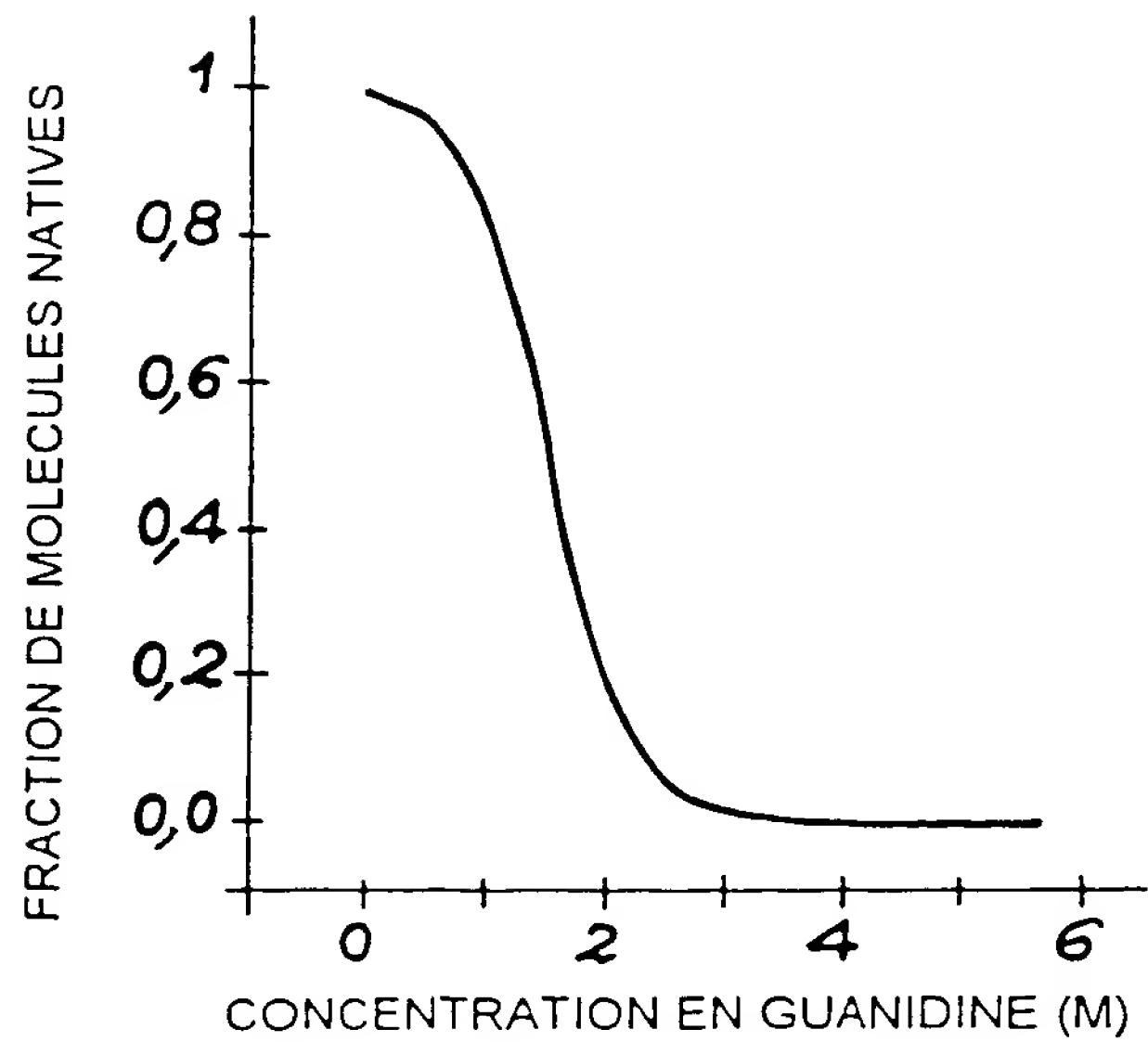


FIG. 4

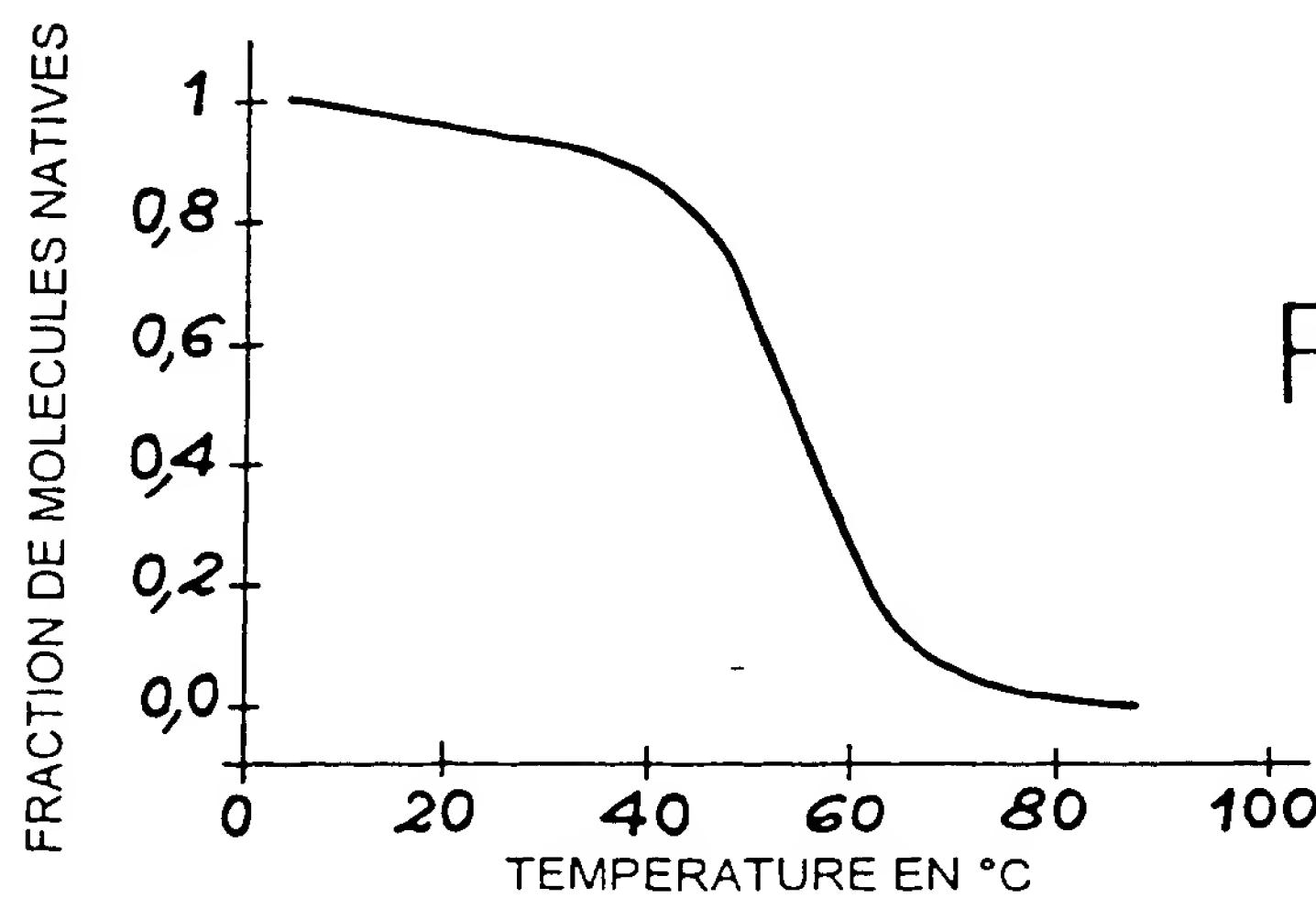


FIG. 5

Domaine 2

Met Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile
 1 5 10
 Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser
 15 20 25
 Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe
 30 35 40
 Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala Ala Leu His Lys Ala Ile Met
 45 50 55
 Val Lys Gly Val Asp Glu Ala Thr Ile Ile Asp Ile Leu Thr
 60 65 70
 Lys Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Gln Ile Lys Ala Ala Tyr
 75 80
 Leu Gln Glu Thr Gly Lys Pro Leu Asp Glu Thr Leu Lys Lys
 85 90 95
 Ala Leu Thr Gly His Leu Glu Glu Val Val Leu Ala Leu Leu
 100 105 110
Lys Thr Pro Ala Gln Phe Asp Ala Asp Glu Leu Arg Ala Ala
 115 120 125
Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Thr Leu Ile Glu Ile
 130 135 140
Leu Ala Ser Arg Thr Asn Lys Glu Ile Arg Asp Ile Asn Arg
 145 150
Val Tyr Arg Glu Glu Leu Lys Arg Asp Leu Ala Lys Asp Ile
 155 160 165
Thr Ser Asp Thr Ser Gly Asp Phe Arg Asn Ala Leu Leu Ser
 170 175 180
Leu Ala Lys Gly Asp Arg Ser Glu Asp Phe Gly Val Asn Glu
 185 190 200
 Asp Leu Ala Asp Ser Asp Ala Arg Ala Leu Tyr Glu Ala Gly
 205 210 215
 Glu Arg Arg Lys Gly Thr Asp Val Asn Val Phe Asn Thr Ile
 220 225
 Leu Thr Thr Arg Ser Tyr Pro Gln Leu Arg Arg Val Phe Gln
 230 235 240
 Lys Tyr Thr Lys Tyr Ser Lys His Asp Met Asn Lys Val Leu
 245 250 260
 Asp Leu Glu Leu Lys Gly Asp Ile Glu Lys Cys Leu Thr Ala
 265 270 275
 Ile Val Lys Cys Ala Thr Ser Lys Pro Ala Phe Phe Ala Glu
 280 285 290
 Lys Leu His Gln Ala Met Lys Gly Val Gly Thr Arg His Lys
 295 300
 Ala Leu Ile Arg Ile Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Met
 305 310 315
 Asn Asp Ile Lys Ala Phe Tyr Gln Lys Met Tyr Gly Ile Ser
 320 325 330
 Leu Cys Gln Ala Ile Leu Asp Glu Thr Lys Gly Asp Tyr Glu
 335 340 345
 Lys Ile Leu Val Ala Leu Cys Gly Gly Asn
 350 355

FIG. 6A: Annexine I humaine

Domaine 1

Met	Ala	Gln	Val	Leu	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Gly
1													
													10
Phe	<u>Asp</u>	Glu	Arg	Ala	Asp	Ala	Glu	Thr	Leu	<u>Arg</u>	Lys	Ala	Met
15													
													25
<u>Lys</u>	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Ser	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu
	30												40
Thr	Ser	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Ser	Ala	Ala
	45												55
<u>Phe</u>	<u>Lys</u>	Thr	Leu	Phe	Gly	<u>Arg</u>	Asp	Leu	Leu	<u>Asp</u>	<u>Asp</u>	Leu	Lys
	60												70
<u>Ser</u>	<u>Glu</u>	Leu	Thr	Gly	<u>Lys</u>	Phe	Glu	<u>Lys</u>	Leu	Ile	Val	Ala	Leu
	75												
Met	<u>Lys</u>	Pro	Ser	Arg	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Glu	Leu	Lys	His
80													
													90
Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Thr	Glu
	95												
													105
Ile	Ile	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys
	110												
													120
Gln	Val	Tyr	Glu	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp
	125												
													135
Val	Val	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Met	Leu	Val
	140												
													145
Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Asn	Arg	Asp	Pro	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp
150													
													160
Glu	Ala	Gln	Val	Glu	Gln	Asp	Ala	Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Ala
	165												
													175
Gly	Glu	Leu	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Lys	Phe	Ile	Thr
	180												
													190
Ile	Phe	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Val	Phe
	195												
													205
Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr
	205												
													210
Ile	Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu
215													
													230
Ala	Val	Val	Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala
	235												
													245
Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp
	250												
													260
His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp
	265												
													275
Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe	Arg	Lys	Asn	Phe	Ala	Thr
	280												
													285
Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr
290													
													300
Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp			
	305												
													315

FIG. 6B : Annexine V humaine

Domaine 2

Met Ala Ser Ile Trp Val Gly His Arg Gly Thr Val Arg Asp
 1 5 10
 Tyr Pro Asp Phe Ser Pro Ser Val Asp Ala Glu Ala Ile Gln
 15 20 25
 Lys Ala Ile Arg Gly Ile Gly Thr Asp Glu Lys Met Leu Ile
 30 35 40
 Ser Ile Leu Thr Glu Arg Ser Asn Ala Gln Arg Gln Leu Ile
 45 50 55
 Val Lys Glu Tyr Gln Ala Ala Tyr Gly Lys Glu Leu Lys Asp
 60 65 70
 Asp Leu Lys Gly Asp Leu Ser Gly His Phe Glu His Leu Met
 75 80
 Val Ala Leu Val Thr Pro Pro Ala Val Phe Asp Ala Lys Gln
 85 90 95
Leu Lys Lys Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Asp Ala
 100 105 110
Leu Ile Glu Ile Leu Thr Thr Arg Thr Ser Arg Gln Met Lys
 115 120 125
Asp Ile Ser Gln Ala Tyr Tyr Thr Val Tyr Lys Lys Ser Leu
 130 135 140
Gly Asp Asp Ile Ser Ser Glu Thr Ser Gly Asp Phe Arg Lys
 145 150
Ala Leu Leu Thr Leu Ala Asp Gly Arg Arg Asp Glu Ser Leu
 155 160 165
Lys Val Asp Glu His Leu Ala Lys Gln Asp Ala Gln Ile Leu
 170 175 180
Tyr Lys Ala Gly Glu Asn Arg Trp Gly Thr Asp Glu Asp Lys
 185 190 195
Phe Thr Glu Ile Leu Cys Leu Arg Ser Phe Pro Gln Leu Lys
 200 205 210
Leu Thr Phe Asp Glu Tyr Arg Asn Ile Ser Gln Lys Asp Ile
 215 220
Val Asp Ser Ile Lys Gly Glu Leu Ser Gly His Phe Glu Asp
 225 230 235
Leu Leu Leu Ala Ile Val Asn Cys Val Arg Asn Thr Pro Ala
 240 245 250
Phe Leu Ala Glu Arg Leu His Arg Ala Leu Lys Gly Ile Gly
 255 260 270
Thr Asp Glu Phe Thr Leu Asn Arg Ile Met Val Ser Arg Ser
 275 280 285
Glu Ile Asp Leu Leu Asp Ile Arg Thr Glu Phe Lys Lys His
 290 295
Tyr Gly Tyr Ser Leu Tyr Ser Ala Ile Lys Ser Asp Thr Ser
 300 305 310
Gly Asp Tyr Glu Ile Thr Leu Leu Lys Ile Cys Gly Gly Asp Asp
 315 320 325

FIG. 6C : Annexine III humaine

Séquence ID n°4

7 / 9

Met Ala Thr Lys Gly Gly Thr Val Lys Ala Ala Ser Gly Phe
1 5 10
Asn Ala Met Glu Asp Ala Gln Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys
15 20 25
Gly Leu Gly Thr Asp Glu Asp Ala Ile Ile Ser Val Leu Ala
30 35 40
Tyr Arg Asn Thr Ala Gln Arg Gln Glu Ile Arg Thr Ala Tyr
45 50 55
Lys Ser Thr Ile Gly Arg Asp Leu Ile Asp Asp Leu Lys Ser
60 65 70
Glu Leu Ser Gly Asn Phe Glu Gln Val Ile Val Gly Met Met
75 80

Thr
85

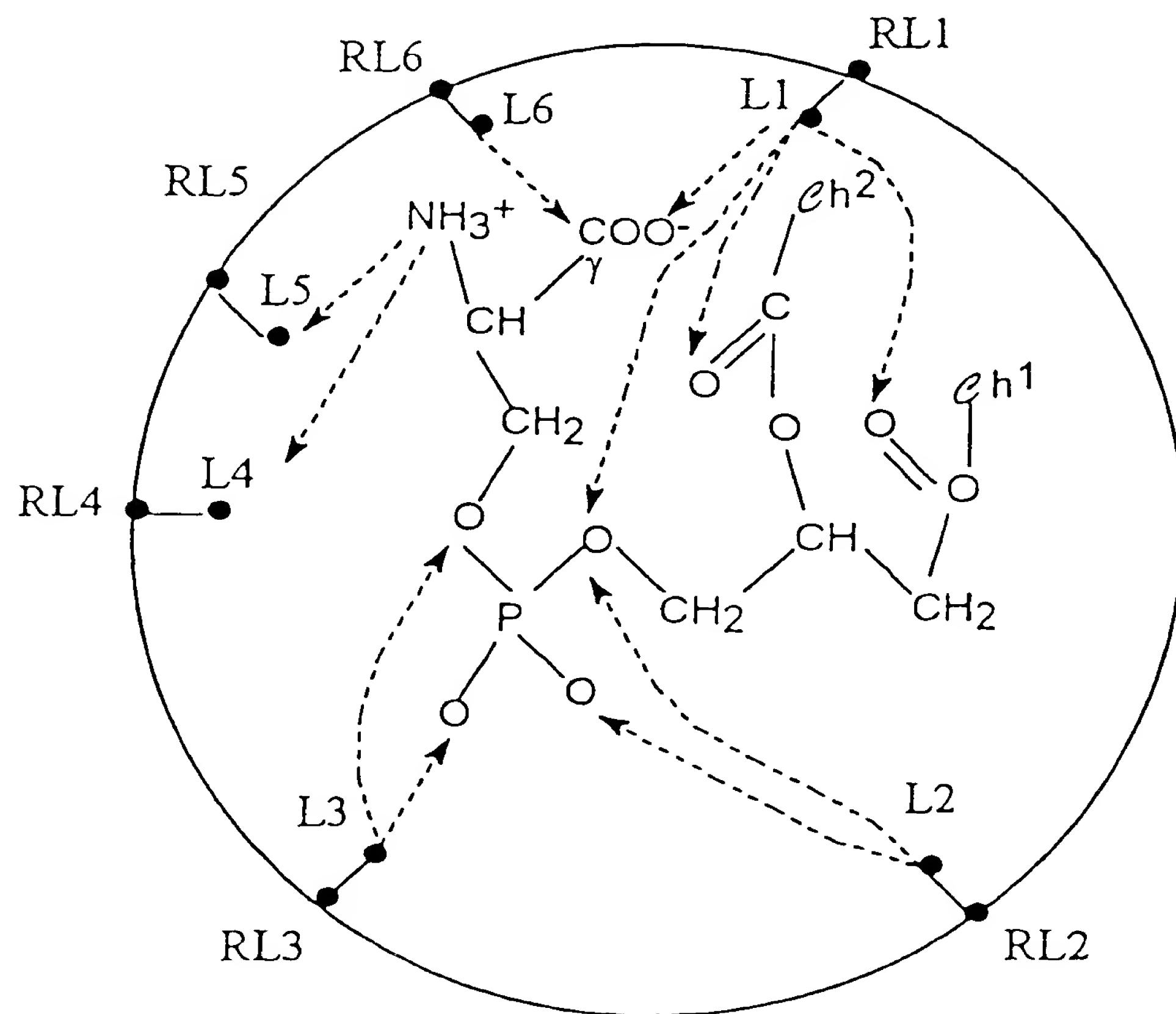
Domaine 1

Séquence ID n°5

Domaine 2

Pro Thr Val Leu Tyr Asp Val Gln Glu Leu Gln Arg Lys
86 90 95
Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Glu Gly Cys Leu Ile Glu
100 105 110
Ile Leu Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Ile Arg Arg Ile Asn
115 120 125
Gln Thr Tyr Gln Leu Gln Tyr Gly Arg Ser Leu Glu Asp Asp
130 135 140
Ile Arg Ser Asp Thr Ser Phe Met Phe Gln Arg Val Leu Val
145 150
Ser Leu Ser Ala Gly Gly Arg Asp Glu Gly Asn Tyr Leu Asp
155 160 170
Asp Ala Leu Val Arg Gln Asp Ala Gln Asp Leu Tyr Glu Ala
175 180 185
Gly Glu Lys Lys Trp Gly Thr Asp Glu Val Lys Phe Leu Thr
190 195 200
Val Leu Cys Ser Arg Asn Arg Asn His Leu Leu His Val Phe
205 210 215
Asp Glu Tyr Lys Arg Ile Ser Gln Lys Asp Ile Glu Gln Ser
220 225
Ile Lys Ser Glu Thr Ser Gly Ser Phe Glu Asp Ala Leu Leu
230 235 240
Ala Ile Val Lys Cys Met Arg Asn Lys Ser Ala Tyr Phe Ala
245 250 255
Glu Lys Leu Tyr Lys Ser Met Lys Gly Leu Gly Thr Asp Asp
260 265 270
Asn Thr Leu Ile Arg Val Met Val Ser Arg Ala Glu Ile Asp
275 280 285
Met Leu Asp Ile Arg Ala His Phe Lys Arg Leu Tyr Gly Lys
290 295
Ser Leu Tyr Ser Phe Ile Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr
300 305 310
Arg Lys Val Leu Leu Val Leu Cys Gly Gly Asp Asp
315 320 325

FIG. 6D : Annexine IV humaine



Composé (I) + phosphatidylsérine

FIG. 7

9 / 9

FIG. 8

